

UNIVERZITA KARLOVA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program: Biologie
Obor: Imunologie



**Chromatinová imunoprecipitace vybraných
transkripčních faktorů**
**Chromatin immunoprecipitation of selected
transcription factors**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: Mgr. Karel Vališ, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Petr Novák, Ph.D.

PRAHA, 2019

Bc. Jitka Smetanová

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovávala samostatně, a že jsem řádně ocitovala všechny použité literární zdroje. Dále prohlašuji, že tato práce ani její část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 3. 1. 2019

.....
Jitka Smetanová

Poděkování:

Ráda bych touto cestou poděkovala svému školiteli Mgr. Karlovi Vališovi, PhD., za vedení diplomové práce. Poděkování patří i RNDr. Petru Novákovi, PhD., a Mgr. Pavlovi Talackovi za rozbor vzorků pomocí hmotnostní spektrometrie. Dále bych ráda poděkovala Ing. Janě Novákové a Mgr. Lucii Hernychové za podporu a spolupráci v laboratoři.

Velký dík patří i ostatním členům laboratoře Strukturní biologie a buněčné signalizace za vytvoření přátelské atmosféry a za nezapomenutelné chvíle strávené v laboratoři i mimo ni.

Dále bych chtěla především poděkovat členům katedry Buněčné biologie. Doc. RNDr. Františkovi Půtovi, Csc., za rady, pomoc a slova podpory při sepisování diplomové práce a prof. RNDr. Janu Černému, PhD., za ochotu a pomoc.

V poslední řadě bych ráda poděkovala celé své rodině, přátelům a kolegům, kteří mě podporovali v průběhu celého studia.

Abstrakt

Rodina transkripčních faktorů TEAD ovlivňuje expresi genů, které regulují buněčnou proliferaci, diferenciaci a apoptózu. Aktivita proteinu TEAD1 je řízena prostřednictvím signální dráhy Hippo. Obecný mechanismus suprese nádorových buněk skrze signální dráhu Hippo zůstává nejasný. Geny *MYC* a *GLUT1*, které kódují dva klíčové regulátory glykolýzy, byly recentně popsány v lidských leukemických buňkách jako potenciální cíle signální dráhy Hippo.

V této diplomové práci jsem se pomocí ChIP analýzy v lidských leukemických buňkách snažila experimentálně potvrdit předpokládanou vazbu transkripčního faktoru TEAD1 k regulačním sekvencím genů *MYC* a *GLUT1*. I přes veškerou snahu se mi nepovedlo provést chromatinovou imunoprecipitaci transkripčního faktoru TEAD1. V rámci diplomové práce jsem navrhla několik možných důvodů, které mohly vést k získaným negativním výsledkům.

Klíčová slova: transkripční regulace, TEAD transkripční faktory, chromatinová imunoprecipitace, leukemie

Abstract

The TEAD family of transcription factors regulates expression of genes affecting cell proliferation, differentiation and apoptosis. The activity of a particular transcription factor called TEAD1 is regulated by the Hippo signalling pathway. The Hippo pathway has been implicated to play a role in cancer suppression, however its precise mechanism remains unclear. *MYC* and *GLUT1*, genes which are coding two key regulators of glycolysis, were recently described as potential targets of the Hippo signalling pathway in human leukemia cells.

In this diploma thesis, I tried to confirm the proposed interaction of the transcription factor TEAD1 with regulatory sequences of *MYC* and *GLUT1* genes using chromatin immunoprecipitation (ChIP) analysis in human leukemic cells. However, I failed to successfully isolate TEAD1 complexes using ChIP. So, I discuss in my diploma thesis also possible reasons for this outcome, including biological and methodological issues.

(In Czech)

Key words: Transcriptional regulation, TEAD transcription factors, chromatin immunoprecipitation, leukemia

Obsah

1. Úvod	11
2. Teoretická část	12
2.1. Signální dráha Hippo	12
2.1.1. Transkripční faktory rodiny TEAD	14
2.1.1.1. Struktura domény TEA	14
2.1.1.2. Vazebný motiv pro transkripční faktory rodiny TEAD	16
2.1.1.3. Struktura domény YBD	17
2.1.1.4. Lokalizace exprese savčích transkripčních faktorů TEAD a jejich úloha v průběhu embryonálního vývoje	18
2.1.1.5. Regulace transkripčních faktorů TEAD posttranslačními modifikacemi	20
2.1.1.6. Cílové geny transkripčních faktorů rodiny TEAD a jejich funkce	20
2.2. Vývoj a metabolismus T-buněk	23
2.2.1. Regulace metabolismu T-buněk	24
2.2.1.1. Vybrané transkripční faktory regulované prostřednictvím PI3K-AKT-mTOR	25
2.2.1.2. Metabolické regulátory T-buněk	27
2.2.1.3. Souvislost mezi metabolismem a transkripčními faktory TEAD	28
3. Cíle diplomové práce	30
4. Materiál a metody	31
4.1. Přístroje a materiál	31
4.1.1. Biologický materiál	31
4.1.2. Přístroje a příslušenství	31
4.1.3. Chemikálie	32
4.1.3.1. Protilátky	33
4.1.3.2. Pufry a roztoky	33
4.1.3.3. Enzymy	34
4.1.3.4. Kity	34
4.2. Metody	35
4.2.1. Kultivace a pasážování buněk	35
4.2.2. Izolace chromatinu	35
4.2.3. Enzymatické štěpení chromatinu	36
4.2.4. Izolace genomové DNA pro stanovení efektivity páru primerů	37

4.2.5.	Příprava jaderného lyzátu.....	37
4.2.5.1.	Stanovení koncentrace proteinů v jaderném lyzátu	38
4.2.6.	Imunoprecipitace pomocí kuliček Dynabeads	38
4.2.6.1.	Navázání protilátky na kuličky Dynabeads	38
4.2.6.2.	Postup imunoprecipitace pomocí kuliček Dynabeads s epoxidovou skupinou	39
4.2.7.	Imunoprecipitace pomocí proteinu-G	40
4.2.8.	Elektroforetická gelová separace	41
4.2.8.1.	Elektroforéza nukleových kyselin	41
4.2.8.2.	Separace proteinů pomocí SDS elektroforézy	42
4.2.9.	Přenos proteinu na nitrocelulosovou membránu.....	43
4.2.10.	Přečištění vyimunoprecipitovaného vzorku před kvantitativní PCR	44
4.2.11.	Polymerázová řetězová reakce	45
4.2.12.	Hmotnostní spektrometrie	46
5.	Výsledky a diskuse.....	47
5.1.	Vybrané páry primerů pro analýzu ChIP-qPCR	47
5.1.1.	Pozice cílových sekvencí a oligonukleotidová sekvence navržených párů primerů pro gen <i>MYC</i>	47
5.1.1.1.	Amplifikační efektivita a specifita navržených párů primerů pro gen <i>MYC</i>	48
5.1.2.	Pozice cílových sekvencí a oligonukleotidová sekvence navrženého páru primeru pro gen <i>GLUT1</i>	50
5.1.2.1.	Amplifikační efektivita a specifita navrženého páru primeru pro gen <i>GLUT1</i>	51
5.2.	Chromatinová imunoprecipitace	53
5.2.1.	Optimalizace fragmentace chromatinu.....	53
5.2.2.	ChIP pomocí kuliček Dynabeads s epoxidovou skupinou.....	56
5.2.2.1.	Ověření ChIP pomocí hmotnostní spektrometrie	56
5.2.2.2.	Monitorování jednotlivých kroků ChIP pomocí metody WB	58
5.2.3.	ChIP s využitím magnetických kuliček s proteinem-G.....	60
5.3.	Testování specifity protilátky pro ChIP	62
5.3.1.	Stanovení koncentrace proteinů ve vzorcích jaderných lyzátů	62
5.3.2.	Test protilátek na detekci proteinu TEAD1	63
5.4.	ChIP pomocí kuliček Dynabeads s navázaným proteinem-G	66
5.4.1.	Ověření ChIP metodou WB.....	66

5.4.2. Ověření ChIP hmotnostní spektrometrií	68
6. Závěr	72
7. Seznam použité literatury	73

Seznam použitých zkratek

<i>Afp</i>	gen kódující α -fetoprotein (z angl. alpha-fetoprotein)
AKT	kináza známá pod jménem protein-kináza B (z angl. protein kinase B)
AMOTL1	angiomotin-podobný protein 1 (z angl. angiomin-like protein 1)
AMPK	AMP-aktivovaná kináza (z angl. AMP-activated protein kinase)
APS	peroxodisíran amonný (z angl. ammonium persulfate)
AXL	gen kódující receptor s tyrosin kinázovou aktivitou (z angl. AXL receptor tyrosine kinase)
bp	páry bazí (z angl. base pair)
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumin)
CD28	diferenciační skupina 28 (z angl. cluster of differentiation 28)
CD80	diferenciační skupina 80 (z angl. cluster of differentiation 80)
CD86	diferenciační skupina 86 (z angl. cluster of differentiation 86)
c-MYC	transkripční faktor kódovaný genem <i>MYC</i> (z angl. Myc proto-oncogene protein)
C_T	počet cyklů, kdy fluorescence přesáhne prahovou hodnotu (z angl. cycle of threshold)
<i>CTGF</i>	gen kódující růstový faktor pojivové tkáně (z angl. connective tissue growth factor)
CTL	cytotoxické lymfocyty (z angl. cytotoxic lymphocytes)
CTLA-4	cytotoxický lymfocytární protein (z angl. cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4)
<i>CYR61</i>	gen kódující induktora angiogeneze (z angl. cysteine-rich angiogenic inducer)
EDC3/4	protein vedoucí k odstranění 5-methylguanosinové čepičky z mRNA (z angl. Enhancer of mRNA-decapping protein 3/4)
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina (z angl. ethylenediaminetetraacetic acid)
EGTA	(z angl. ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid)
FBS	fetální hovězí sérum (z angl. fetal bovine serum)
<i>FGFR2</i>	gen kódující receptor fibroblastového růstového faktoru (z angl. fibroblast growth factor receptor 2)
<i>FOXA2</i>	gen kódující transkripční faktor FOXA2 (z angl. forkhead box protein A2)
<i>GATA4</i>	gen kódující transkripční faktor GATA4 (z angl. GATA binding protein 4)
<i>GATA6</i>	gen kódující transkripční faktor GATA6 (z angl. GATA binding protein 6)
<i>GLUT1</i>	gen kódující glukózový transportér prvního typu (z angl. glucose transporter 1)
HIF1 α	hypoxií indukovaný transkripční faktor (z angl. Hypoxia-inducible factor 1-alpha)
HSD	signální dráha Hippo (z angl. Hippo signalling pathway)
HSP	protein tepelného šoku (z angl. heat shock protein)
ChIP	chromatinová imunoprecipitace (z angl. chromatin immunoprecipitation)
ChIP-MS	chromatinová imunoprecipitace s následnou hmotnostní spektrometrií (z angl. chromatin interacting protein-mass spectrometry)

ChIP-qPCR	chromatinová imunoprecipitace spojená s kvantitativní PCR (z angl. chromatin Immunoprecipitation - quantitative PCR)
ChIP-seq	chromatinová imunoprecipitace s následným sekvenováním DNA (z angl. chromatin immunoprecipitation sequencing)
KIBRA	protein aktivující signální dráhu Hippo (z angl. kidney and brain expressed protein)
LATS1/2	tumor supresorové kinázy signální dráhy Hippo (z angl. large tumor supresor)
LBK1	jaterní kináza B1 (z angl. liver kinase B1)
MAP4K4	stresem aktivovaná kináza (z angl. Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4)
M-CAT	sekvence nukleotidů bohatá na báze cytosin, adenin a thymin (z angl. muscle-cytosine, adenine, thymine)
MOB1A/1B	enzym signální dráhy Hippo (z angl. Mps one binder kinase activator-like1A/B)
MST1/2	kinázy signální dráhy Hippo známé též pod názvem STK3/4 (z angl. mammalian STE20-like protein kinase)
mTOR	savčí cíl rapamycinu (z angl. mammalian target of rapamycin)
mTORC1/2	savčí komplex cílem rapamycinu (z angl. mammalian target of rapamycin complex 1/2)
MYC	gen kódující transkripční faktor c-MYC (z angl. Myc proto-oncogene)
NAD ⁺	oxidovaná forma koenzymu nikotinamidadenindinukleotidu (z angl. nicotinamide adenine dinucleotide)
NADH+H ⁺	redukována forma koenzymu nikotinamidadenindinukleotidu (z angl. nicotinamide adenine dinucleotide)
NAIP	gen kódující inhibiční protein apoptózy (z angl. NLR Family Apoptosis Inhibitory Protein)
NF2	tumor-supresorový protein (z angl. Neurofibromin 2)
NGS	sekvenování nové generace (z angl. next generation sequencing)
OGT	O-vázaná N-acetylglukosamin transferáza (z angl. O-linked N-acetylglucosamine transferase)
PBS	fosfátový pufr (z angl. phosphate buffered saline)
PCR	polymerázová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
PDK1	pyruvát-dehydrogenázová kináza (z angl. pyruvate dehydrogenase kinase)
PDK1	kináza závislá na fosfatidylinositolu (z angl. 3-phosphoinositide-dependent kinase 1)
PFK1	fosfofruktokináza (z angl. phosphofructokinase-1)
PHD2	doména prolyl-hydroláz obsahující protein 2 (z angl. prolyl hydroxylase domain-containing protein 2)
PP2	serin-threoninová fosfatáza (z angl. protein phosphatase)
PTPN14	fosfatáza (z angl. protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 14)

PI3K	fosfatidylinositol-3 kináza (z angl. phosphatidylinositide 3-kinase)
qPCR	kvantitativní PCR
<i>RHAMM</i>	gen kódující receptor pro pohyblivost zprostředkovanou hyaluronanem (z angl. receptor for hyaluronan mediated motility)
RIPA	pufr pro radioimunoprecipitační esej (z angl. radio-immunoprecipitation assay)
SAV1	adaptorový protein signální dráhy Hippo (z angl. Salvador homolog 1)
SIRT6	deacetyláza (z angl. sirtuin 6)
SDS	dodecylsírán sodný (z angl. sodium dodecyl sulfate)
SV40	polyomavirus nacházející se u lidí i opic (z angl. simian vacuolating virus 40)
TAE	pufr obsahující Tris, kyselinu octovou a EDTA (z angl. Tris base, acetic acid, EDTA)
TAZ	koaktivátor TEAD transkripčních faktorů (z angl. transcriptional coactivator with PDZ domain)
TCA	cyklus trikarboxylových kyselin (z angl. tricarboxylic acid cycle)
TCR	receptor na povrchu T-buněk (z angl. T-cell receptor)
TEAD	rodina transkripčních faktorů mající TEA vazebnou doménu (z angl. transcriptional enhancer activator domain)
TEF-1	jiný název pro TEAD1 (z angl. transcriptional enhancer factor 1)
TGS	pufr pro SDS elektroforézu obsahující Tris, glycin, PBS (z angl. Tris, Glycine, PBS)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin (z angl. Tetramethylethylenediamine)
Tris	tris(hexomethyl)aminomethan (z angl. tris(hydroxymethyl)aminomethane)
TSC2	protein tuberózní sklerózy (z angl. Tuberous sclerosis complex 2)
TTBS	Tris-pufrovaný fyziologický roztok obsahující Tween (z angl. Tris buffered saline with Tween)
YAP	koaktivátor transkripčního faktoru rodiny TEAD (z angl. Yes associated protein)
YBD	doména transkripčních faktorů TEAD vážící koaktivátory YAP/TAZ (z angl. YAP –binding domain)

1. Úvod

Od počátku 21. století na celém světě významně vzrostl počet úmrtí na nádorové onemocnění. Podle statistických údajů třetina občanů České republiky během svého života prodělá nádorové onemocnění a dokonce každý čtvrtý boj s touto nemocí prohraje (Internetové zdroje a databáze 1). Příčinou více než poloviny výskytu nádorových onemocnění jsou mutace genů kódující proteiny signálních kaskád. A proto jsou aktuálním tématem výzkumu klíčové složky signálních drah, jejichž deregulace vede k transformaci zdravých buněk na nádorové. Díky novým poznatkům je známo stále více látek, které působí na terapeutické cíle. Jako potencionálně významným cílem se jeví onkogen *MYC*, kdy zvýšená exprese transkripčního faktoru c-MYC je spojována s progresí mnoha typů nádorových onemocnění, jako jsou například lymfomy nebo leukémie (Delgado and León, 2010). Aby se předešlo rozvoji nádoru, je nutné regulovat míru exprese tohoto proteinu (Vališ *et al.*, 2016). Důležitým regulátorem genové exprese proteinu c-MYC představujícím perspektivní cíl výzkumu zaměřeného na studium protinádorové léčby je signální dráha Hippo (HSD) a její cílové transkripční faktory z rodiny obsahující DNA vazebnou doménu TEA (TEAD).

2. Teoretická část

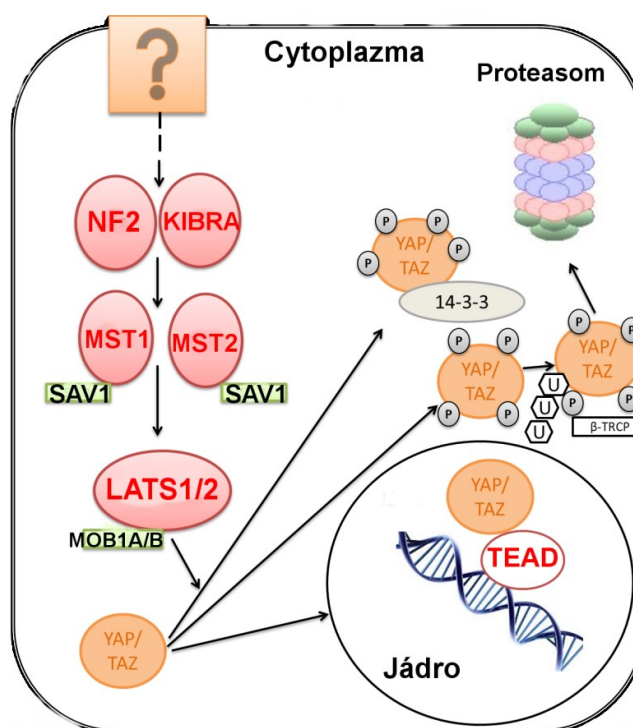
2.1. Signální dráha Hippo

Poprvé byly klíčové složky HSD popsány u eukaryotického organismu *Drosophila melanogaster* (octomilka obecná) a získané poznatky byly později využity pro odvození podobných vlastností a funkcí savčích ortologů, jejichž počet do dnešní doby stoupl na čtyřicet (Meng *et al.*, 2016). Konzervované složky HSD nacházející se i u primitivních jednobuněčných eukaryotických organismů jsou zodpovědné za kontrolu proliferace a diferenciaci buněk (Pan, 2007; W. Wang *et al.*, 2014).

Mezi klíčové složky savčí HSD (někdy nazývané kinázové jádro) patří regulační serin-threoninové kinázy MST1/2, kinázy inhibující vznik tumoru LATS1/2 a adaptorový protein Salvador homolog SAV1 (Callus *et al.*, 2006). Zmíněný adaptorový protein tvoří lešení, které propojuje MST1/2 s kinázami LATS1/2, čímž umožňuje jejich vzájemnou interakci. Další nedílnou součástí centrální části HSD jsou adaptorové proteiny MOB1A/1B, jež především ovlivňují aktivitu kináz LATS1/2 (Praskova *et al.*, 2008). Zmíněné uspořádání proteinů hlavní části HSD a jejich vzájemné interakce vedou k signální kaskádě, kde aktivní kinázy MST1/2 fosforylují kinázy LATS1/2. Aktivované kinázy LATS1/2 následně v signální kaskádě fosforylací inhibují aktivitu dvou transkripčních regulátorů – YES-asociovaného proteinu YAP a transkripčního ko-aktivátoru s PDZ vazebnou doménou TAZ (Dong *et al.*, 2007; Mitani *et al.*, 2009). V cytoplasmě buňky dochází k vychytávání a později k hromadění fosforylovaného onkoproteinu YAP v komplexu s proteinem 14-3-3 (Ren *et al.*, 2010). Hromadění proteinu vyústí v označení E3 ubiquitin ligázou a v následnou degradaci v proteasomu (Zhao *et al.*, 2010). Aktivní HSD zmíněným způsobem ovlivňuje velikost tkání a zabraňuje jejich nadměrné proliferaci.

Naopak v případě, kdy HSD není aktivována, nefosforylované onkoproteiny YAP/TAZ se přesouvají do jádra, kde dochází k vazbě těchto onkoproteinů na proteiny TEAD (Mahoney *et al.*, 2005). Vzájemná interakce vede ke spuštění transkripce cílových genů, kterých je v dnešní době popsáno více než čtyřicet. V případě, kdy má buňka nízkou koncentraci α -cateninů, dochází působením proteinové fosfatázy PP2 k defosforylaci onkoproteinů a jejich následnému pohybu do buněčného jádra (Schlegelmilch *et al.*, 2011). Schéma HSD je uvedeno na obr. 1.

V poslední době bylo popsáno několik proteinů spouštějících hlavní složky HSD. Mezi ně patří například serin-threoninová kináza TAO, která přímo aktivuje MST1/2 (Boggiano *et al.*, 2011). Dalším významným stimuletem je mitogenem aktivovaná kináza MAP4K4, která fosforyluje kinázy LATS1/2 (Meng *et al.*, 2015). Nepostradatelnou aktivační úlohu mají i proteiny buněčných spojů, které regulují aktivitu YAP/TAZ. Mezi ty mimo jiné náleží nереceptorová fosfatáza PTPN14 nebo transmembránový E-kadherin (Kim *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012). Aktivaci HSD vyvolá i kontakt dvou aktivovaných cytotoxických lymfocytů (CTL) respektive jejich povrchových cytotoxických lymfocytárních receptorů CTLA-4 s koreceptory CD80 (Thaventhiran *et al.*, 2012).

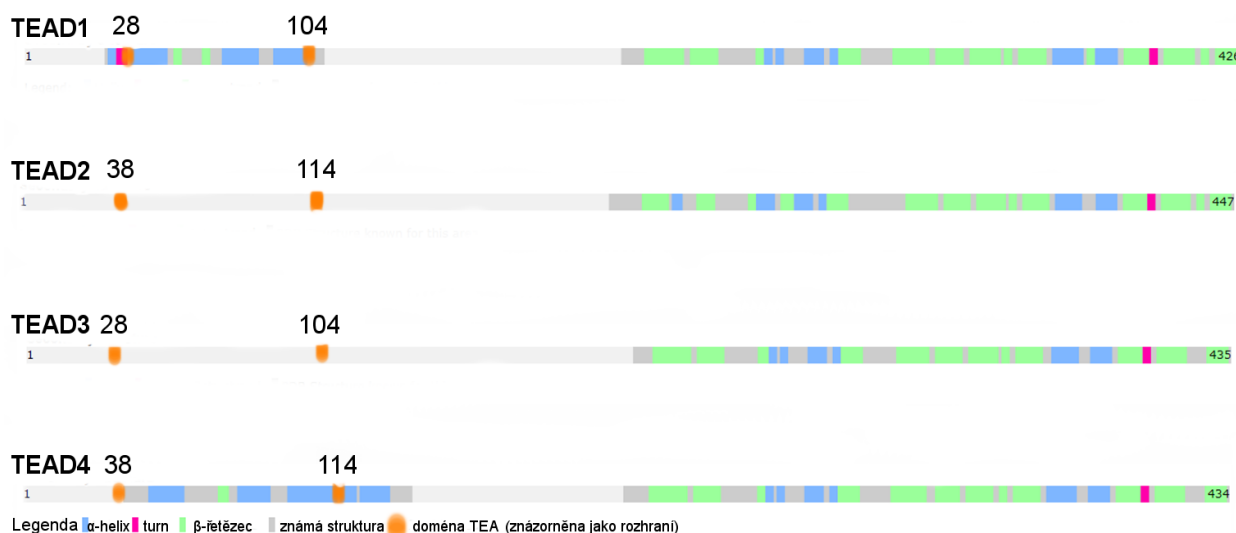


Obr. 1: Schéma HSD. Např. aktivovaný protein exprimovaný v buňkách mozku a ledvin KIBRA a tumor-supresorová molekula NF2 finálně vedou k aktivaci kináz LATS, jež tlumí koaktivátory YAP/TAZ. Fosforylované onkoproteiny jsou buď degradovány v proteasomu, nebo jsou v cytoplasmě vychytávány a zadržovány proteinem 14-3-3. Když HSD není aktivní, onkoproteiny se přesouvají do buněčného jádra. Tam interagují s transkripčními faktory rodiny TEAD, čímž je spuštěna transkripce cílových genů. Přerušovaná čára značí doposud neobjasněný mechanismus aktivace.

2.1.1. Transkripční faktory rodiny TEAD

Rodina transkripčních faktorů TEAD ovlivňuje aktivitu spousty cílových genů. Prvním transkripčním faktorem z rodiny TEAD byl na konci 20. století objeven v jádře lidských HeLa buněk TEAD1. V jádře těchto buněk aktivuje vazbou na tři odlišné sekvence enhanceru polyomaviru SV40 transkripci cílových genů (Davidson *et al.*, 1988; Xiao *et al.*, 1987).

V buňkách obratlovců byly nalezeny čtyři proteiny náležící do rodiny transkripčních faktorů TEAD - TEAD1, TEAD2, TEAD3 a TEAD4. Charakteristickým znakem těchto proteinů je přítomnost dvou evolučně konzervovaných domén. První z nich je DNA vazebná doména TEA dlouhá 72-78 aminokyselin, kterou najdeme na N-konci proteinu. Podle domény TEA, která zaujímá necelou jednu čtvrtinu celého proteinu, dostaly transkripční faktory i svůj název (Bürglin, 1991). Druhou konzervovanou doménou je doména vážící koaktivátory YAP/TAZ (YBD), jež je rovněž nezbytná pro aktivaci exprese cílových genů. Doposud se nikomu nepovedlo vyřešit celou strukturu proteinů z rodiny TEAD. Porovnání lidských transkripčních faktorů TEAD a jejich doposud objasněná stavba je znázorněna na obr. 2.

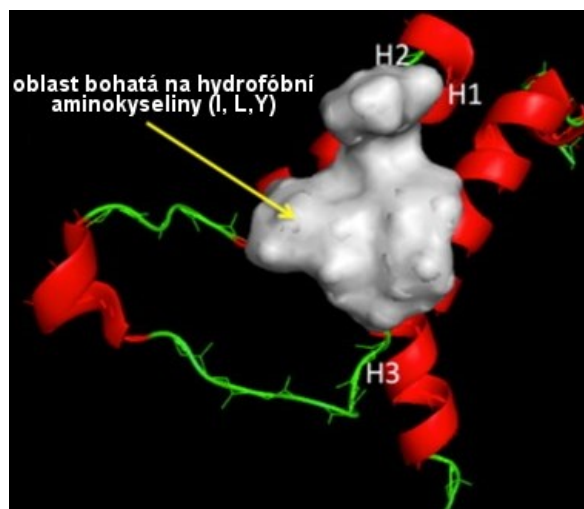


Obr. 2: Porovnání lidských transkripčních faktorů TEAD. Převzato a upraveno z databáze Uniprot, viz (Internetové zdroje a databáze 2).

2.1.1.1. Struktura domény TEA

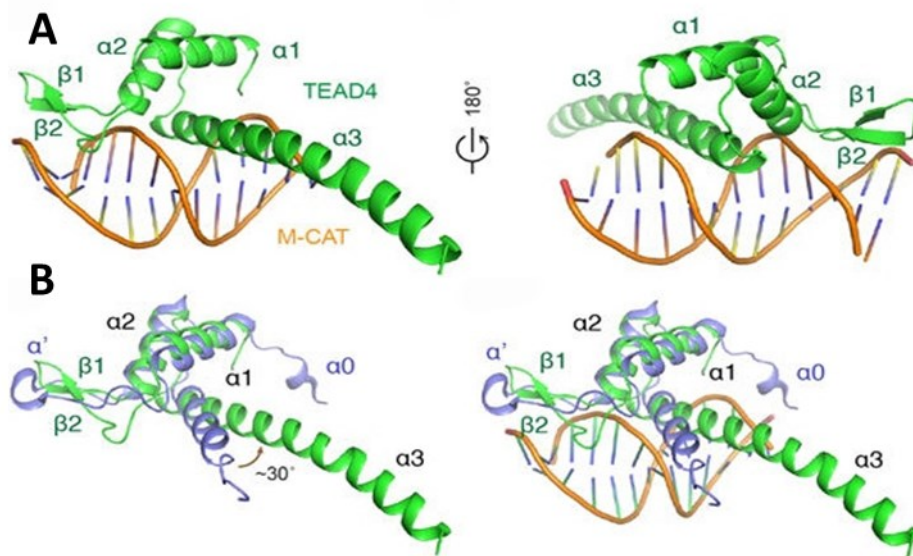
Mnoho výzkumných skupin se soustředí na studium struktury domény TEA. Pomocí nukleární magnetické rezonance byla v roce 2006 vyřešena struktura domény

TEA, jež ji popisuje jako globulární protein skládající se ze dvou β -smyček a tří α -helixů (na obr. 3 znázorněny jako H1, H2, H3), z nichž dva jsou ve vzájemném antiparalelním postavení (Anbanandam *et al.*, 2006). Dále byla popsána hlavní část bohatá na hydrofobní aminokyseliny, jež je stěžejní pro protein-proteinové interakce (Landin-Malt *et al.*, 2016). 3D struktura domény TEA je znázorněna na obr. 3.



Obr. 3: 3D struktura domény TEA skládající se ze dvou β -smyček a tří α -helixů (H1, H2 a H3). Pro protein-proteinové interakce je stěžejní oblast bohatá na hydrofobní aminokyseliny. Převzato a upraveno z (Landin-Malt *et al.*, 2016).

O rok později, v roce 2017, byla pro transkripční faktor TEAD4 vyřešena krystalová struktura domény TEA v komplexu s DNA. Tato krystalová struktura transkripčního faktoru TEAD4 s navázanou sekvencí DNA společně s porovnáním znázorňujícím α -helix ($\alpha 3$) jako stěžejní komponentu pro interakci proteinů s DNA je pro TEAD1 i TEAD4 znázorněna na obr. 4.



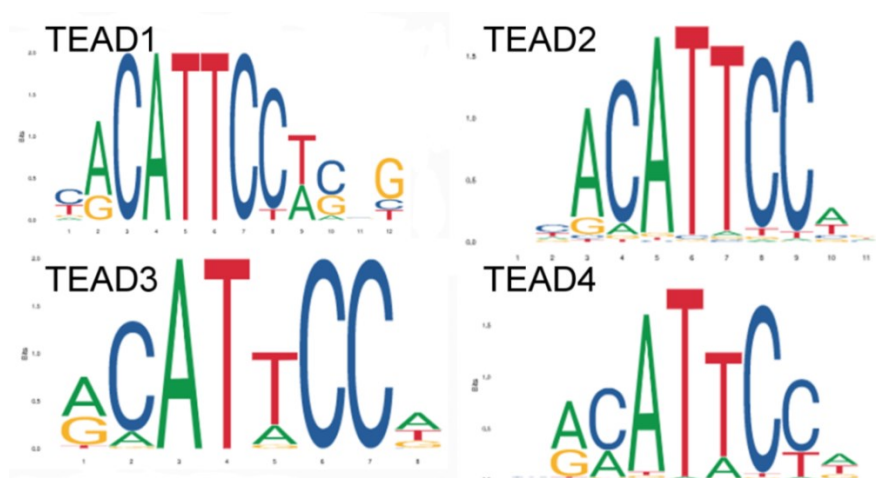
Obr. 4: (A): Krystalová struktura domény TEA transkripčního faktoru TEAD4 v komplexu s DNA vazebnou sekvencí. (B): Porovnání transkripčních faktorů TEAD1 a TEAD4 ve stavu bez navázané DNA – tzv. apo stav (vlevo) a v komplexu s DNA (vpravo). Protein TEAD1 je znázorněn modře a TEAD4 zeleně. Převzato a upraveno z (Shi *et al.*, 2017).

2.1.1.2. Vazebný motiv pro transkripční faktory rodiny TEAD

První objevený transkripční faktor z rodiny TEAD – TEAD1 byl v lidských HeLa buňkách navázán na enhancer viru SV40 na následující sekvence: 5'-TGGGAATGTG-3', 5'-AAGCATGCA-3', 5'-AAGTATGCA-3'. Zmíněné polynukleotidové sekvence jsou známé pod názvy motivů: GT-IIC, Sph-I a Sph-II (Davidson *et al.*, 1988).

Ukázalo se, že transkripční faktory rodiny TEAD se také váží na úseky DNA bohaté na báze cytosin, adenin a thymin tzv. M-CAT vazebné sekvence, nacházející se v enhancerech a promotorech mnoha genů. Mezi ně patří geny exprimované převážně svalovými buňkami, jako jsou např. α -aktin, troponin I nebo T (Farrance *et al.*, 1992; Swartz *et al.*, 1998; Yoshida, 2008). Obecně je důležitá sekvence 5'-ATTCC-3', kterou transkripční faktory rodiny TEAD prostřednictvím své domény TEA váží. Jednotlivé členy transkripčních faktorů rodiny TEAD (TEAD1, TEAD2, TEAD3 a TEAD4) se odlišují zastoupením jednotlivých nukleotidů v cílovém vazebném elementu. Frekvence zastoupených nukleotidů v M-CAT vazebném elementu je pro lidské transkripční faktory TEAD znázorněna poměrem a velikostí bází nukleotidů na obr. 5. TEAD1 se váže na obecnou cílovou sekvenci M-CAT: 5'-CATTCC-3', TEAD2 se navíc může potencionálně vázat i na sekvenci 5'-AATTCC-3'. Nejvíce

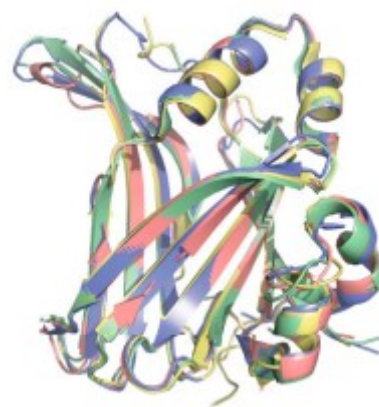
variabilní jsou v tomto ohledu transkripční faktory TEAD3 a TEAD4. TEAD3 může v cílových sekvencích rozeznávat místo cytosinu a thyminu adenin stejně jako transkripční faktor TEAD4 (Internetové zdroje a databáze 3).



Obr. 5: Porovnání obecných cílových sekvencí transkripčních faktorů rodiny TEAD M-CAT vazebných elementů a jejich okolí u lidských transkripčních faktorů z rodiny TEAD (TEAD1, TEAD2, TEAD3 a TEAD4). Data byla získána z databáze JASPAR, viz (Internetové zdroje a databáze 3).

2.1.1.3. Struktura domény YBD

230 aminokyselin dlouhá konzervovaná doména YBD nacházející se na C-konci proteinu byla dodnes popsána pro všechny čtyři lidské homology transkripčních faktorů TEAD (Chen *et al.*, 2010; Noland *et al.*, 2016; Tian *et al.*, 2010). Porovnání odhalilo, že domény YBD se mezi jednotlivými transkripčními faktory TEAD shodují ve více než 70 %. Ve všech čtyřech případech ji tvoří dva páry α -helixů a dva β -skládané listy, které připomínají strukturu imunoglobulinové domény (Noland *et al.*, 2016). Porovnání domén YBD je znázorněno na obr. 6.



Obr. 6: Porovnání domén YBD pro TEAD1 (zelená), TEAD2 (růžová), TEAD3 (modrá) a TEAD4 (žlutá). Převzato a upraveno z (Noland *et al.*, 2016)

Transkripčním faktorům z rodiny TEAD chybí aktivační doména, pomocí které by byly schopny samy aktivovat transkripci cílových genů. Z tohoto důvodu vytvářejí funkční heterodimery s koaktivátory YAP/TAZ (Pobbati and Hong, 2013).

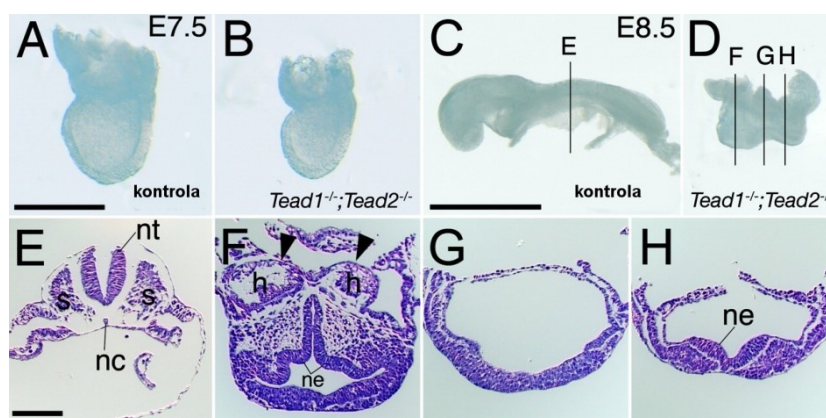
2.1.1.4. Lokalizace exprese savčích transkripčních faktorů TEAD a jejich úloha v průběhu embryonálního vývoje

V každé tkáni byla potvrzena exprese minimálně jednoho transkripčního faktoru z rodiny TEAD. Můžeme najít i orgány, jako jsou plíce, kde dochází k expresi všech čtyř transkripčních faktorů této rodiny. Jednotlivé členy rodiny TEAD se vzájemně odlišují především tím, v jaké fázi vývoje organismu dochází k jejich expresi (Jacquemin *et al.*, 1998). Funkce a lokalizace exprese proteinů TEAD byly popsány především u myší, protože se poměrně snadným způsobem dají připravit jedinci s defektními geny kódující proteiny TEAD. Dalším důvodem je vysoká podobnost savčích transkripčních faktorů z rodiny TEAD, kdy myší se od lidských liší řádově v jednotkách aminokyselin (Kaneko and DePamphilis, 1998; Sawada *et al.*, 2008).

V průběhu embryonálního vývoje organismu byl dokázán výskyt proteinu Tead1 v srdečním svalu, kde je nezbytný pro jeho správný rozvoj. Pokud mají myší embrya poškozený gen kódující transkripční faktor Tead1, dochází k jejich úmrtí mezi 11. a 12. dnem vývoje (Chen *et al.*, 1994). Exprese transkripčního faktoru Tead1 nebyla sledována pouze v průběhu vývoje myší, ale i u *Xenopus leavis* (drápatka vodní), kde byla jeho exprese potvrzena v oku, mozku a srdci (Naye *et al.*, 2007). I srdeční tkáň dospělých jedinců charakterizuje přítomnost proteinu Tead1. Dokonce jeho nadměrná exprese může vyústit až v srdeční selhání (Tsika *et al.*, 2010). Pro dospělé organismy nejsou buňky myokardu jediným důležitým místem exprese genu *Tead1*, ale k produkci dochází i v kosterním a hladkém svalstvu nebo v životně důležitém orgánu – plíci (Liu *et al.*, 2014, 2017). Mezi lidské buněčné linie s přítomným proteinem TEAD1 patří nádorové buňky slinivky (Hucl *et al.*, 2007) nebo prostaty (Knight *et al.*, 2008). Kromě nádorových buněk byla jeho exprese dokázána i ve Schwannových buňkách nacházející se v periferní nervové oblasti (Lopez-Anido *et al.*, 2016).

Nejvíce exprimovaným genem z rodiny TEAD je na počátku embryonálního vývoje *Tead2*, kdy je na rozdíl od transkripčního faktoru Tead1, exprimován téměř po celém embryu (Wang and Latham, 2000). Svou funkci zastává především při vývoji nervové soustavy - uzavírání neurální trubice (Kaneko *et al.*, 2007). Stejně jako Tead1, i Tead2 se podílí na vývoji mesodermu a notochordu (Sawada *et al.*, 2005, 2008). Dále bylo v roce 2008 dokázáno, že v průběhu embryonálního vývoje může dojít k nahrazení funkcí Tead1 transkripčním faktorem Tead2 a obráceně. Výjimkou je

pouze vývoj srdeční tkáně, kde nedochází k expresi *Tead2* (Sawada *et al.*, 2008). Vývoj embryí jedinců *Tead1^{-/-}Tead2^{-/-}* v porovnání se zdravými jedinci je znázorněn na obr. 7.



Obr. 7: Porovnání vývoje embryí zdravého jedince a jedince s defektními geny *Tead1* a *Tead2*. A-D zobrazují vnější pohledy na embrya a E-H příčné histologické řezy. (nc: notochord, nt: neurální trubice, ne: neuroektoderm, h: srdeční trubice, s: somity). Převzato a upraveno z (Sawada *et al.*, 2008).

Ve srovnání s embryi, u dospělých jedinců míra exprese transkripčního faktoru *Tead2* klesá, a jeho výskyt se omezuje pouze na vybrané životně důležité orgány, jako jsou například ledviny a plíce (Kaneko *et al.*, 2007). Z lidských tkání je nejvíce exprimovaný v endometriu, vaječnících a hladkém svalstvu.

Posledním objeveným transkripčním faktorem z rodiny TEAD je *Tead3*. V průběhu embryonálního vývoje drápatky vodní byla jeho existence prokázána v jejím trupu, mozku a oku (Naye *et al.*, 2007). Dospělí jedinci mají transkripční faktor *Tead3* přítomen především v placentě, endometriu a hladkém svalstvu.

Bylo dokázáno, že *Tead4* je nutný pro vývoj blastocelu. Z tohoto důvodu jedinci s defektním genem *Tead4* umírají stejně jako jedinci s defektním genem *Tead1* ještě před narozením. V porovnání s ostatními transkripčními faktory rodiny TEAD je *Tead4* jediným členem, který se kromě do buněčného jádra pohybuje i do mitochondrií. A proto se *Tead4* svou aktivitou podílí na udržení energetického rovnovážného stavu (Kaneko and DePamphilis, 2013). V průběhu života dospělých jedinců je tento transkripční faktor exprimován především v alveolárních buňkách a v buňkách kosterního svalstva (Kaneko *et al.*, 2007). Dále byla jeho exprese potvrzena v nádorových buňkách tlustého střeva (Liu *et al.*, 2016).

2.1.1.5. Regulace transkripčních faktorů TEAD posttranslačními modifikacemi

Nedávné studie upozorňují na fakt, že aktivita transkripčních faktorů TEAD není regulována pouze jejich vazbou s koaktivátory, ale také posttranslačními modifikacemi (Lin *et al.*, 2017). Mezi tyto posttranslační modifikace patří fosforylace protein-kinázou A nebo C, které inhibují vazbu domény TEA k DNA (Gupta *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2001).

Další posttranslační modifikací, ke které dochází po syntéze proteinů rodiny TEAD, je S-palmitoylace. Jedná se o modifikaci, při níž je kovalentní vazbou připojen zbytek kyseliny palmitové na SH skupinu cysteinu (Lin *et al.*, 2017). Tato posttranslační modifikace ovlivňuje nejen stabilitu, ale také transkripční aktivitu proteinů TEAD (Noland *et al.*, 2016). Navíc bylo prokázáno, že S-palmitoylace je důležitá pro vazbu transkripčního faktoru TEAD1 ke koaktivátorům YAP/TAZ (Chan *et al.*, 2016).

2.1.1.6. Cílové geny transkripčních faktorů rodiny TEAD a jejich funkce

Mezi cílové geny, jejichž transkripce je řízena aktivitou transkripčních faktorů rodiny TEAD, řadíme ty, které mimo jiné ovlivňují růst organismu (Pan, 2007). Mezi první objevené geny, jejichž exprese je závislá na interakci YAP/TAZ-TEAD, náleží gen kódující růstový faktor pojivové tkáně *CTGF* a gen kódující faktor bohatý na aminokyselinu cystein vedoucí k angiogenezi *CYR61*. Proteiny kódované těmito geny patří mezi faktory ovlivňující průběh apoptózy nebo migraci buněk (Zhang *et al.*, 2009, 2011). Navíc bylo zjištěno, že oba produkty genů způsobují u buněk rakoviny prsu rezistenci na taxol (Lai *et al.*, 2011).

Dalším cílovým genem transkripčních faktorů TEAD je gen kódující receptor s tyrosin kinázovou aktivitou *AXL* vedoucí ke zrychlenému růstu, dělení buněk a tvorbě metastáz tím, že potlačuje programovanou buněčnou smrt (Xu *et al.*, 2011). Mezi další geny podílející se na proliferaci buněk řadíme protein inhibující apoptózu náležící do NLR rodiny *NAIP*, který inhibuje štěpení prokaspázy-3 kaspázou-9 (Landin Malt *et al.*, 2013).

Již dříve byla popsána stěžejní role transkripčních faktorů rodiny TEAD v průběhu vývoje hladkého i kosterního svalstva. Proto tyto transkripční faktory ovlivňují řadu genů, které jsou exprimované ve svalových buňkách. Zmíněné geny kódují například těžký řetězec myosinu nebo α -actin (Yoshida, 2008).

Transkripční faktory TEAD se nepodílí pouze na vývoji svalu, ale také na expresi regulačních genů slinivky břišní, které kódují například receptor fibroblastového růstového faktoru *FGFR2*, transkripční faktor obsahující tzv. forkheadbox DNA vazebnou doménu *FOXA2*, *GATA6* nebo *GATA4* (Cebola *et al.*, 2015).

Některé transkripční faktory rodiny Tead nádorových buněk jater myši zvyšují expresi genů ovlivňujících proliferaci buněk. Mezi tyto geny patří α -fetoprotein *Afp* nebo *H19* (Dong *et al.*, 2007b). Transkripční faktory z této rodiny dále regulují expresi genu kódující receptor pro pohyblivost zprostředkovanou hyaluronanem *RHAMM* vedoucí k tvorbě metastáz buněk nádoru prsu (Z. Wang *et al.*, 2014).

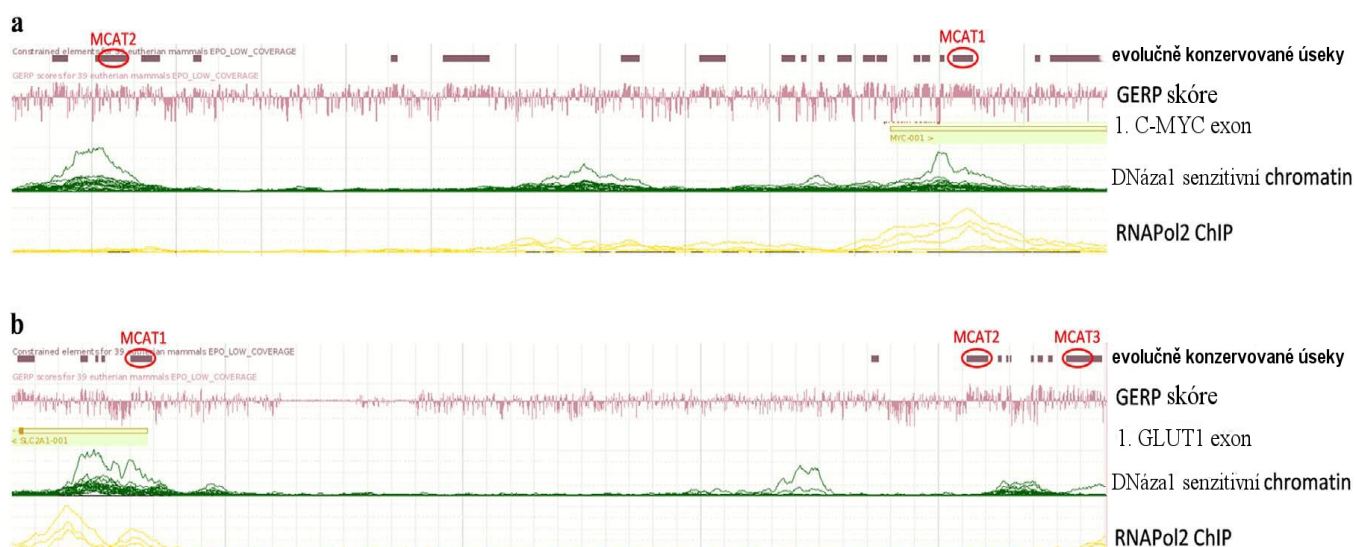
Dále byl jejich vliv popsán i na úrovni buněčného cyklu. U nervových progenitorových buněk ovlivňují expresi cyklinu D1. Zvýšená koncentrace cyklinu D1 urychluje průběh buněčného cyklu a navíc nepřímo zabraňuje předčasné diferenciaci buněk (Cao *et al.*, 2008).

2.1.1.7. Současný stav poznání regulačních mechanismů TEAD1 proteinem

Dosud bylo provedeno několik chromatinových imunoprecipitací s následným sekvenováním DNA (ChIP-seq), které odhalily přítomnost aktivních M-CAT vazebných elementů v genomu. V roce 2016 byly M-CAT vazebné motivy pro transkripční faktory TEAD potvrzeny v promotoru genu periferního myelinového proteinu *PMP22* Schwannových buněk (Lopez-Anido *et al.*, 2016).

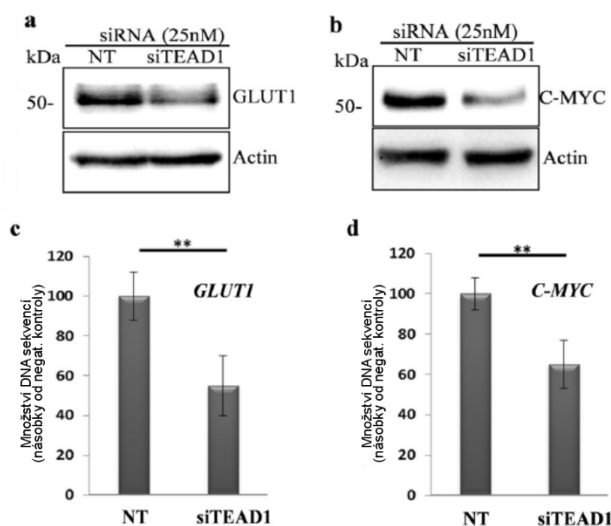
Kromě Schwannových buněk se pro ChIP-seq analýzu využily i multipotentní kmenové buňky. M-CAT vazebné elementy byly nalezeny i v enhanceru genu *SOX9*, který se rovněž podílí na vývoji slinivky břišní (Cebola *et al.*, 2015).

Dodnes nebyla ChIP-seq analýza provedena na leukemických buňkách. V naší laboratoři byla provedena bioinformatická analýza *MYC* promotoru, kde byly objeveny konzervované M-CAT elementy v místě aktivního chromatinu. M-CAT vazebné elementy byly rovněž nalezeny i v promotoru genu *GLUT1* (Vališ *et al.*, 2016), jejichž pozice jsou pro geny *GLUT1* a *MYC* znázorněny na obr. 8.



Obrázek 8: Pozice M-CAT vazebných elementů pro geny *MYC* (a) a *GLUT1* (b). Převzato a upraveno z (Vališ *et al.*, 2016).

Dále bylo zjištěno, že metabolické geny *MYC* i *GLUT1* jsou pravděpodobně u leukemických T-buněk regulovány proteinem TEAD1. Poté, co byla v leukemických buňkách inhibována produkce proteinu TEAD1 pomocí technologie siRNA, došlo ke snížení exprese proteinů c-MYC a GLUT1 (Vališ *et al.*, 2016). Snížení množství exprimovaného proteinu c-MYC a GLUT1 ve srovnání s kontrolními buňkami je dokumentován na obr. 9.



Obr. 9: Snížení exprese proteinů c-MYC a GLUT1 po inhibici proteinu TEAD1 pomocí siRNA. Snížení exprese je dokázáno metodou WB (a, b) i kvantitativní PCR (c, d). Vzorkem negativní kontroly (NT) jsou buňky, které byly transfekovány necílovými siRNA. Převzato a upraveno z (Vališ *et al.*, 2016).

2.2. Vývoj a metabolismus T-buněk

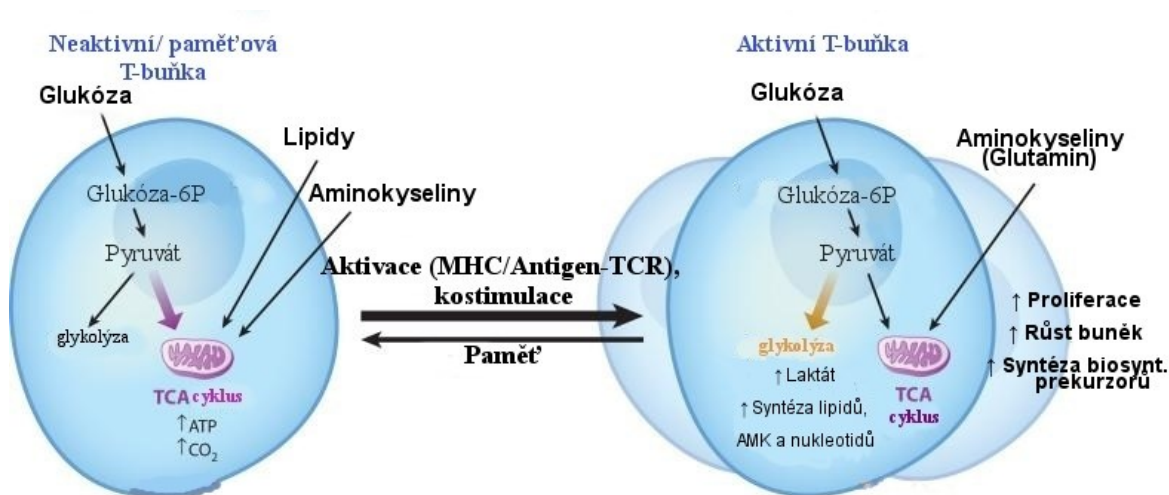
Mezi bílé krvinky vyvíjející se v kostní dřeni řadíme mimo jiné i T-buňky, které mají nepostradatelnou úlohu v adaptivním imunitním systému. K jejich zrání dochází v brzlíku, kde jsou pozitivně a negativně selektovány. Po ukončení vývoje se pohybují do sekundárních lymfatických orgánů, kde může dojít k jejich aktivaci.

Naivní T-buňky získávají energii ve formě ATP stejně jako většina ostatních buněk glykolýzou a oxidační fosforylací (MacIver *et al.*, 2013). Při glykolýze se glukóza sledem reakcí přeměňuje na meziprodukty vstupující do dalších metabolických drah a konečný produkt pyruvát, který se působením enzymu pyruvátdehydrogenázy přeměňuje na acetyl-CoA, jež vstupuje do citrátového cyklu (na obr. 10 znázorněn jako cyklus trikarboxylových kyselin-TCA).

V případě, kdy T-buněčný receptor (TCR) vyskytující se na povrchu T-buněk rozezná antigen, dojde nejprve k proliferaci, následné diferenciaci na efektorové buňky, ke změně jejich metabolismu a epigenetickým změnám (Wilson *et al.*, 2009).

Pro rychlé dělení a růst aktivovaných T-buněk je nutné, aby měly dostatečné množství energie a organických látek. Z tohoto důvodu aktivované T-buňky svůj metabolismus posouvají směrem ke glykolýze a k reakcím vedoucím k biosyntéze stěžejních makromolekul, jako jsou nukleové kyseliny, lipidy, sacharidy nebo proteiny (MacIver *et al.*, 2013). Uvádí se, že rychle množící se T-buňky přeměňují až 85 % glukózy na laktát a pouze 3 % glukózy oxidují na finální produkt TCA cyklu – CO₂ (Brand *et al.*, 1988). Vzhledem k tomu, že buňky v tuto chvíli potřebují vyšší přísun glukózy, zvyšují expresi GLUT1 (Michalek *et al.*, 2011). Změny buněčného metabolismu, ke kterým dochází během aktivace T-buněk, jež jsou zásadní pro proliferaci a růst T-buněk, jsou znázorněny na obr. 10.

Změna buněčného metabolismu, ke které dochází v průběhu aktivace T-buněk, se podobá změně, k níž se uchylují rychle množící se nádorové buňky. Ty využívají jako zdroj energie glykolýzu, jejíž finální produkt přeměňují působením enzymu laktátdehydrogenázy na kyselinu mléčnou. Tato přeměna je nezbytná pro regeneraci kofaktoru nikotinamidadenindinukleotidu z jeho redukované formy NADH+H⁺ na oxidovanou NAD⁺. Glykolýza navíc nádorovým buňkám poskytuje i další stěžejní sloučeniny, bez kterých se rychle množící buňka neobejde (Vander Heiden *et al.*, 2009; WARBURG, 1956).



Obr. 10: Změna metabolismu T-buněk doprovázející jejich aktivaci. Převzato a upraveno z (MacIver *et al.*, 2013).

2.2.1. Regulace metabolismu T-buněk

Jako významný regulátor buněčného metabolismu byla popsána PI3K-AKT-mTOR signální dráha, k jejíž aktivaci dochází přes TCR a kostimulační receptor CD28 na povrchu T-buněk (Frauwrith *et al.*, 2002). Po interakci CD28 s jeho ligandy, přítomnými na povrchu aktivovaných antigen prezentujících buněk CD80/CD86, dochází k aktivaci fosfatidylinositolové kinázy PI3K, která fosforyluje hydroxylovou skupinu membránového fosfolipidu - fosfatidylinositolu. To má za následek aktivaci enzymu závislého na fosfatidylinositolu PDK1 a následnou aktivaci serin-threoninové kinázy AKT (Lawlor *et al.*, 2001).

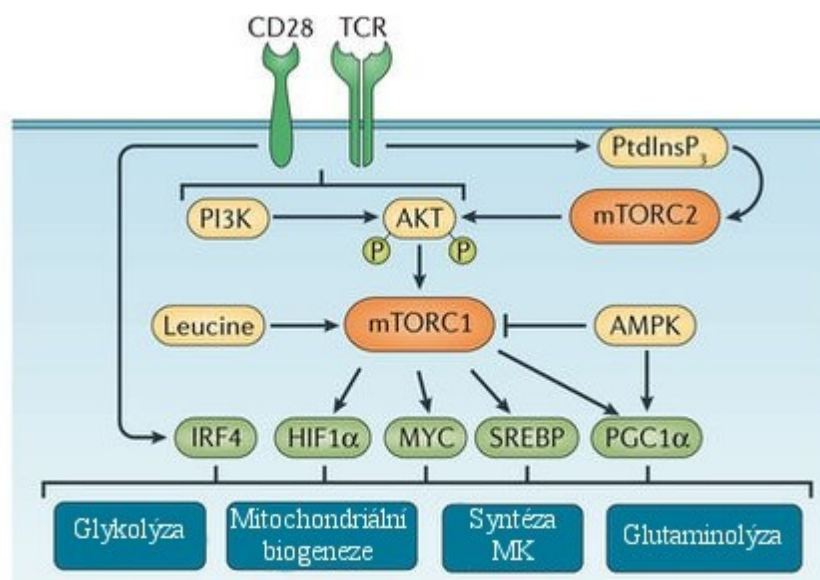
AKT dále v signální kaskádě fosforylací tlumí aktivitu proteinu tuberózní sklerózy TSC2. Inhibice TSC2 společně se snížením aktivity kinázy AMPK, která je závislá na poměru AMP/ATP, vede k aktivaci serin-threoninové kinázy mTOR (Sekulić *et al.*, 2000). Mezi hlavní povinnosti kinázy AKT patří regulace glykolýzy.

Na regulaci buněčného metabolismu se zásadním způsobem podílí i kináza mTOR, která reaguje na podněty z vnějšího a vnitřního prostředí. mTOR se obvykle nachází v podobě dvou různých komplexů – mTORC1 a mTORC2 (Wullschleger *et al.*, 2006). mTORC1 reaguje na změnu hladiny stresu, kyslíku nebo růstových faktorů. Dále se také podílí na kontrole buněčného růstu a svou činností zvyšuje expresi proteinů v buňce (Iadevaia *et al.*, 2012). Kináza AKT společně s komplexem mTORC1 řídí aktivitu transkripčních faktorů, které ovlivňují metabolické přeprogramování T-

buněk (Bantug *et al.*, 2017). Zmíněná signální dráha s cílovými transkripčními faktory je vyobrazena na obr. 11.

Komplex mTORC2 byl popsán jako důležitý regulátor aktinových vláken cytoskeletu. Tento fakt byl později potvrzen i u neutrofilů, kde mTORC2 reguluje aktivitu aktinových i myozinových vláken skrze adenylátcyklázu, která zvyšuje hladinu cAMP (Liu *et al.*, 2010; Sarbassov Dos D *et al.*, 2004).

Nedávno, v roce 2018, bylo popsáno, že komplex mTORC2 je důležitý pro epigenetické změny, kdy v jádře buněk nepřímo ovlivňuje acetylaci lysinu 56 histonu H3 tím, že snižuje aktivitu deacetylázy SIRT6 (Vadla and Haldar, 2018). Na druhou stranu oba dva proteinové komplexy spojuje významná role řízení aktivity buněčného metabolismu. V porovnání s mTORC1 není mTORC2 senzitivní na antibiotikum rapamycin.



Obr. 11: Schéma PI3K-AKT-mTOR signální dráhy s cílovými transkripčními faktory, které řídí metabolické přeprogramování T-buněk. Převzato a upraveno z (Bantug *et al.*, 2017).

2.2.1.1. Vybrané transkripční faktory regulované prostřednictvím PI3K-AKT-mTOR

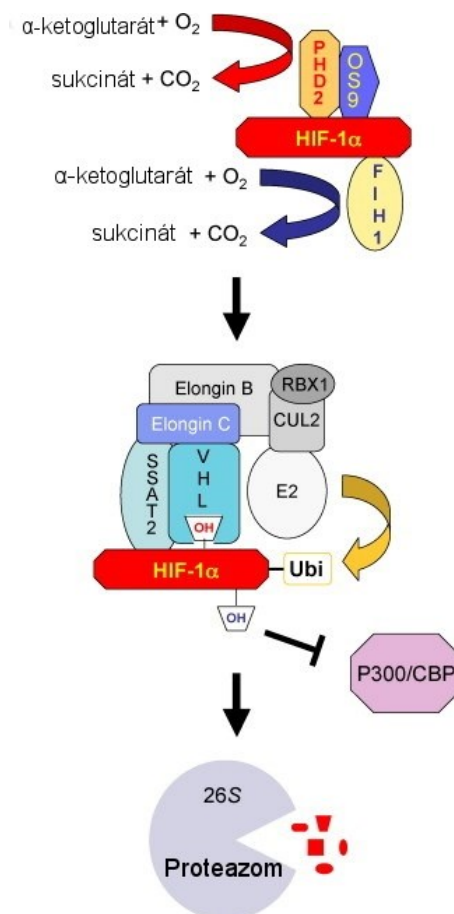
Mezi cílové transkripční faktory regulované skrze PI3K-AKT-mTOR signální dráhu mimo jiné patří c-MYC a HIF1α. K expresi genu *MYC* dochází u T-buněk velmi brzy po jejich aktivaci, čímž ovlivňuje aktivitu mnoha cílových genů. Produkty těchto cílových genů mají nepostradatelnou úlohu, jak v průběhu metabolismu, tak buněčného cyklu. Mezi zmíněné geny, jejichž aktivita je regulována transkripčním

faktorem c-MYC, patří enzymy účastníci se metabolismu glukózy, jako jsou laktátdehydrogenáza A nebo GLUT1 (Shim *et al.*, 1997). Dále je c-MYC důležitý pro regulaci tvorby α -ketoglutarátu nebo glutaminolýzy, při které se glutamin sledem biochemických reakcí přeměňuje na meziproducty TCA (Wise *et al.*, 2008).

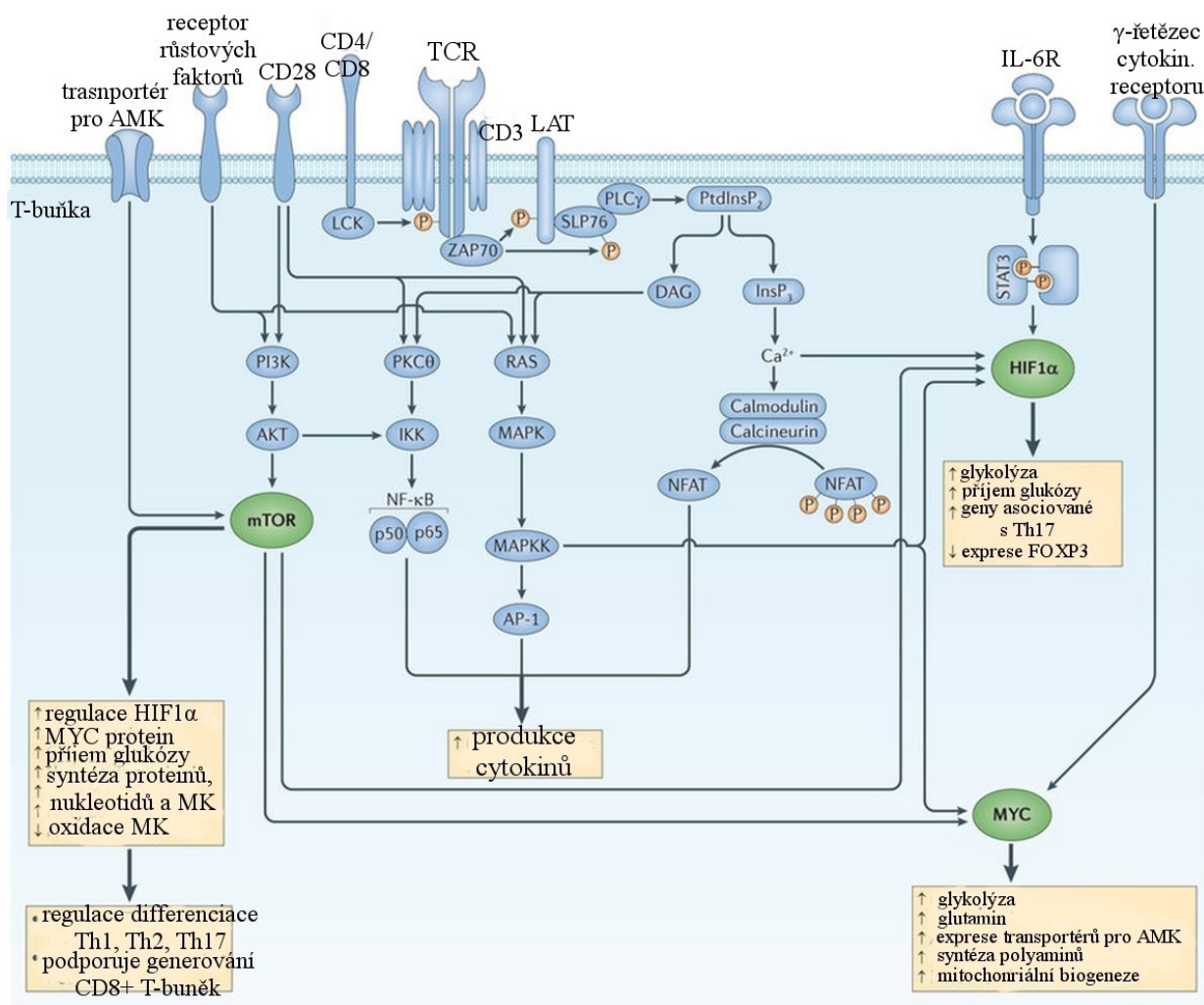
Dalším důležitým již zmíněným transkripčním faktorem je HIF1 α . Za spotřeby kyslíku a α -ketoglutarátu je prolin transkripčního faktoru HIF1 α působením enzymu PHD2 hydroxylován. Na vnesenou hydroxylovou skupinu transkripčního faktoru se dále váže tumor supresorový protein VHL a v komplexu s dalšími proteiny zapříčiní označení transkripčního faktoru ubiquitinem a jeho následnou degradaci v proteasomu. (Salceda and Caro, 1997; Semenza, 2009). Mechanismus degradace HIF1 α za aerobních podmínek je znázorněn na obr. 12.

V průběhu hypoxie dochází k akumulaci transkripčního faktoru HIF1 α , která zapříčiní transkripci mnoha jeho cílových genů, díky nimž jsou buňky schopné přežít i v prostředí s nedostatkem kyslíku (Manalo *et al.*, 2005). Tyto geny kódují enzymy, které jsou stěžejní

pro průběh glykolýzy. Působením transkripčního faktoru HIF1 α dále dochází ke zvýšení exprese genu *GLUT1* (Iyer *et al.*, 1998). Dalším popsáním cílem transkripčního faktoru HIF1 α je pyruvát dehydrogenázová kináza PDK1, jež svou aktivitou inhibuje přeměnu pyruvátu na acetyl-CoA (Kim *et al.*, 2006). Koncentrace kyslíku v okolním prostředí buňky není jediným faktorem ovlivňujícím aktivitu transkripčního faktoru HIF1 α . Mezi další stěžejní regulátory patří kináza mTOR (Sun *et al.*, 2011). Propojení metabolismu a aktivace T-buněk je znázorněno na obr. 13.



Obr. 12: Degradace HIF1 α za aerobních podmínek. Převzato a upraveno z (Semenza, 2009).

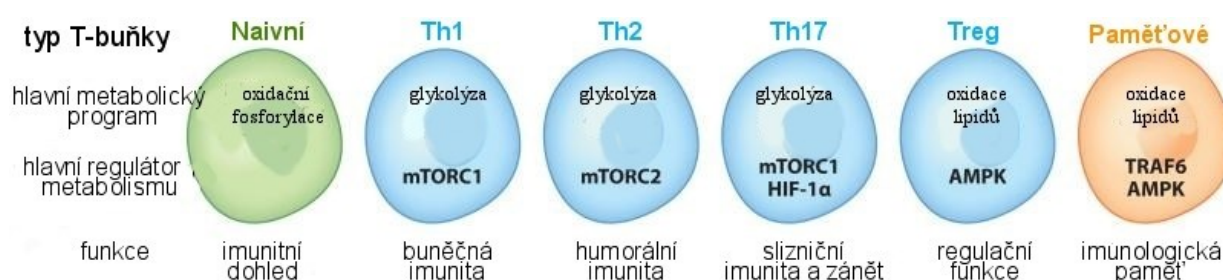


Obrázek 13: Schéma propojení metabolismu a aktivace T-buněk. Zeleně jsou znázorněny transkripční regulátory T-buněk a modře kanonické signální dráhy. Převzato a upraveno z (Pollizzi and Powell, 2014).

2.2.1.2. Metabolické regulátory T-buněk

Vzhledem k tomu, že nejen pro aktivaci T-buněk je velmi důležitá změna jejich metabolismu, mnoho výzkumných týmů se soustředí na studium metabolických regulátorů. Bylo zjištěno, že ne u všech typů T-buněk probíhá metabolický posun z oxidativní fosforylace směrem ke glykolýze působením stejných metabolických regulátorů, jejichž přehled je pro jednotlivé typy T-buněk znázorněn na obr. 14 (MacIver *et al.*, 2013).

V průběhu imunitní odpovědi na antigen se kromě efektorových buněk tvoří i paměťové buňky, které jsou mimo jiné důležitou podstatou očkování, protože jsou zodpovědné za rychlou sekundární imunitní odpověď. Pro tvorbu paměťových buněk je důležité metabolické přeprogramování. Dále je pro ně jako klíčový metabolický regulátor popisována kináza AMPK, jejíž aktivita je inhibována sníženým poměrem AMP/ATP (Hardie, 2011). K aktivaci kinázy AMPK dochází dvěma způsoby, a to buď působením jaterní kinázy LKB1, nebo vlivem energetického stresu na buňku (Shaw *et al.*, 2004).



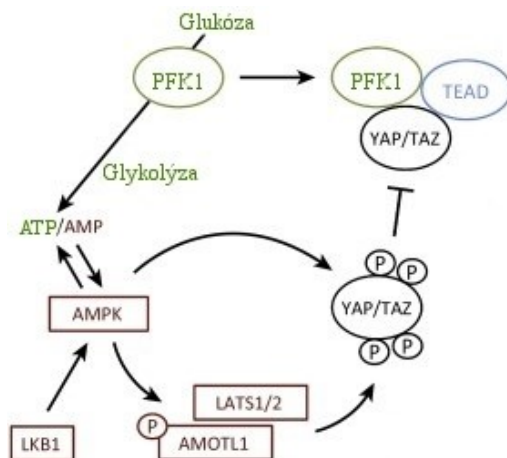
Obr. 14: Jednotlivé typy T-buněk a pro ně charakteristické metabolické programy a regulátory. Převzato a upraveno z (MacIver *et al.*, 2013).

2.2.1.3. Souvislost mezi metabolismem a transkripčními faktory TEAD

Metabolismus glukózy je stěžejní nejen pro metabolické přeprogramování T-buněk, ale také se významně podílí na aktivitě a stabilitě komplexu transkripčního faktoru TEAD společně s jeho koaktivátory. Za dostatečného množství energie vykazují onkoproteiny YAP/TAZ pro-tumorgenní aktivitu, kdy k jejich pohybu do buněčného jádra napomáhá právě zvýšená koncentrace glukózy, při které dochází působením acetylglukosaminyltransferázou OGT ke glykosylaci YAP na serinu 109. Glykosylace inhibuje interakci onkoproteinu YAP s kinázami LATS1/2, čímž brání jejich fosforylaci a degradaci v proteasomu (Peng *et al.*, 2017).

Naopak při sníženém množství glukózy dochází v lidských buňkách k poklesu aktivity onkoproteinů YAP (Santionon *et al.*, 2016). Navíc bylo zjištěno, že k onkoproteinu YAP se váže fosfofruktokináza PFK1, jež v průběhu glykolýzy katalyzuje přeměnu fruktózy-6P a ATP na ADP a fruktózu-1,6-bisP. Kromě této reakce PFK1 dále ovlivňuje spolupráci onkoproteinů YAP/TAZ s transkripčním faktorem

TEAD (Enzo *et al.*, 2015). Mechanismus regulace YAP/TAZ-TEAD pomocí glykolýzy je znázorněn na obr. 15.



Obr. 15: Transkripční aktivita YAP/TAZ je ovlivněna glykosylací, glykolýzou a jejím stěžejním enzymem PFK1. Stresem nebo kinázou LKB1 aktivovaná AMPK fosforyluje AMOTL1, který přes kinázy HSD vede k fosforylaci YAP/TAZ a jejich inhibici. Komplexy podporující pro-tumorgenní aktivitu YAP/TAZ jsou znázorněny zeleně a naopak inhibující komplexy červeně. Převzato a upraveno z (Santion *et al.*, 2016).

3. Cíle diplomové práce

V rámci předkládané diplomové práce si klademe za cíl provést chromatinovou imunoprecipitaci transkripčního faktoru TEAD1 a zjistit, zda se tento transkripční faktor váže k M-CAT motivům nalezených v enhanceru a promotoru genů *MYC* a *GLUT1*. Za tímto účelem bylo potřeba provést následující kroky:

- Výběr vhodných párů primerů pro qPCR kvantifikaci TEAD1 v oblasti potencionálně cílových genů *MYC* a *GLUT1*
- Zesíťení a izolace chromatinu leukemických T-buněk linie Jurkat
- Optimalizace času štěpení chromatinu pomocí enzymu *Miccrococcal Nuclease*
- Ověření chromatinové imunoprecipitace pomocí hmotnostní spektrometrie a metody Western Blot

4. Materiál a metody

4.1. Přístroje a materiál

4.1.1. Biologický materiál

Leukemické T-buňky linie Jurkat (klon E6.1., ATTC Collection, USA)

4.1.2. Přístroje a příslušenství

Aparatura na SDS elektroforézu (*BIORAD*, USA)

Aparatura pro přenos proteinů Trans-blot[®] SD Semi-dry transfer cell (*BIORAD*, USA)

Automatické pipety Pipet-LITE XLS (*RAININ*, Kanada)

Automatické počítadlo buněk (*Logos Biosystems Luna II*, USA)

Box hluboce mrazící MDF DV500VF-PE (*Panasonic*, Japonsko)

Bürkerova komůrka (*P-lab*, CZ)

CCD kamera ChemiDoc[™] MP Imaging systém (*BIORAD*, USA)

Centrifuga PK 110 (*ALC*, Itálie)

Centrifuga 5424R (*Eppendorf*, Německo)

Centrifuga Concentrator Plus (*Eppendorf*, Německo)

CO₂ inkubátor MCO-170AIC (*Panasonic*, Japonsko)

Destičky Hard-Shell[®] PCR Plates, 96 walls, thin-wall (*BIORAD*, USA)

Tissue culture Testplate 96F (*TPP*, Švýcarsko)

Elektrický zdroj PowerPac[™] HC (*BIORAD*, USA)

Filtrační papír Extra Thick Block Paper (*BIORAD*, USA)

Hmotnostní spektrometr Thermo Orbitrap Fusion Q-OT- qIT (*ThermoFisher Scientific*, USA)

Kultivační láhve Tissue culture Flask 300 a 150 cm² (*TPP*, Švýcarsko)

Laminární box 212 (*SafeFAST Classic*, Itálie)

Magnetický stojan 6 Tubes Magnetic Separation Rack (*New England Biolabs*, UK)

Nitrocelulosová membrána póry o velikosti 40 μm (*SANTA Cruz Biotechnology*, USA)

PCR CFX 96[™] Real-Time System (*BIORAD*, USA)

Rotátor Bio-RS 24 Mini Rotator (*BIOSAN*, Litva)

Spektrofotometr Synergy HT (*BioTek*, USA)

Spektrofotometr a fluorometr Ds-11 FX+ (*DENOVIX*, USA)

Termostat a třepačka Mixing Block MB-102 (*BIOER*, Čína)

Třepačka (*Benchmark Scientific*, Taiwan)

Váhy EMB 600-2 (*KERN*®, Německo)

Vakuový koncentrátor RC10-10 (*JOUAN*, Francie)

Vortex V-1 plus (*Biosan*, Litva)

4.1.3. Chemikálie

Agaróza LSL-LE 8200 (*Lonza*, USA)

Amoniak vodný roztok 25% p. a. (*Lachner*, CZ)

AMPure XP (*Beckman Coulter*, CZ)

Akrylamid (*BIORAD*, USA)

APS (peroxodisíran amonný, *Sigma Aldrich*, CZ)

Azid sodný (*Amresco*, Francie)

Benzonáza (*Merck*, Německo)

BSA (hovězí sérový albumin, *Serva* Německo)

Detergent: Nonidet NP40 (4-Nonylphenyl-polyethylene glycol, *Sigma Aldrich*, CZ)

Dodecylsírán sodný (SDS, *BIORAD* USA)

EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina, *Active Motif*, Belgie)

EGTA(ethylenglykol-bis[β-aminoethylether]-N,N,N,N-tetraoctová kyselina, *Sigma Aldrich*, CZ)

FBS (Fetální hovězí sérum, *ThermoFisher Scientific*, USA)

Formaldehyd 37% vodný roztok (*Sigma Aldrich*, CZ)

GelRed Nuclei Acid Stain Solution 10 000x in water (*Biotium*, USA)

Glycerol (*Sigma Aldrich*, CZ)

Hypotonický pufr 10x (*Active Motif*, Belgie)

Inhibitory proteáz Halt™Protease Phosphatase Inhibitor Cocktail 100x (*ThermoFisher Scientific*, USA)

Isopropanol (*Sigma Aldrich*, CZ)

Kyselina kumarová (*Sigma Aldrich*, CZ)

Kuličky Dynabeads s navázaným proteinem G Dynabeads™ Protein-G 30 mg/mL invitrogen (*ThermoFisher Scientific*, USA)

Luminol (*Sigma Aldrich*, CZ)

Master Mix SsoFast™ EvaGreen® Supermix (*BIORAD*, USA)

Médium BioWhittaker® RPMI 1640 s L-Glutaminem, FBS a ATB (LONZA, USA)
Odtučněné sušené mléko Blotting-Grade Blocker (BIORAD, USA)
Peroxid vodíku (*Fluka Analytical*, Německo)
Proteináza K o koncentraci 2 mg/ml (*Sigma Aldrich*, CZ)
RNázaA o koncentraci 10 mg/ml (*ThermoFisher Scientific*, USA)
Sigma voda (*Sigma Aldrich*, CZ)
Standard pro elektroforézu Precision Plus Protein Standards, All Blue (*BIORAD*, USA)
Standard pro elektroforézu DNA: 100 bp DNA ladder (*Promega*, USA)
Substrát Super Signal West Femto Trial Kit (*ThermoFisher Scientific*, USA)
TEMED (tetramethylethyldiamin, *Sigma Aldrich*, CZ)

4.1.3.1. Protilátky

Bridging Ab myší IgG, š: 10615006 (*Active Motif*, Belgie)
IgG Isotype control, š: 821800119 (*GeneTex*, USA)
Negativní kontrola myší IgG š: 13316028 (*Active Motif*, Belgie)
PanTEAD (D3F7L) monoklonální králičí protilátka, š: 13295S (*Cell Signalling*, USA)
RNA pol. II myší IgG, š: 14716034, *Active Motif* (Belgie)
Sekundární kozí HRP-Ab proti králičímu IgG, š: A1416 (*Santa Cruz Biotechnology*, USA)
Sekundární kozí HRP-Ab proti myšímu IgG, š: K1915 (*Santa Cruz Biotechnology*, USA)
Sekundární králičí HRP-Ab proti kozímu IgG, š: C3015 (*Santa Cruz Biotechnology*, USA)
TEAD1 (D9X2L) králičí monoklonální protilátka, š: 12292S (*Cell Signalling*, USA)
TEF-1 polyklonální králičí protilátka, š: 821803774, 821705077 (*GeneTex*, USA)
TEF-1 (133533) monoklonální králičí protilátka, š: GR3214408-2 (*Abcam*, UK)
TEF-1 monoklonální myší protilátka, š: 42037 (*Sigma Aldrich*, CZ)
TEF-1 (221367) polyklonální králičí protilátka, š: GR3241744-1 (*Abcam*, UK)

4.1.3.2. Pufry a roztoky

Extrakční pufr pro kuličky Dynabeads s epoxidovou skupinou (2 ml 5x IP, 0,1 ml inhibitorů proteáz, 0,2 ml 5 M NaCl, 7,7 ml dH₂O)
HPHEB pufr (1 µl 0,5 M EDTA, 34 µl vodného roztoku amoniaku, 965 µl dH₂O)
LWB pufr (800 µl 5xLWB, 3 200 µl dH₂O)
TAE pufr 50x (2 M Tris-acetát, 0,05 M EDTA, pH 8.3)
Tris (tris(hexomethyl)aminomethan) pufr (0,1M; pH 8,8)

TTBS pufr (50 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,05% v/v Tween 20; pH 7.6)

PBS pufr (0,15 M NaCl; 0,3 mM KCl; 1 mM Na₂HPO₄; 0,2 mM K₂HPO₄; pH 7,4, *Sigma Aldrich*, CZ)

Přenosový pufr (48 mM Tris; 39 mM Glycin; 20% methanol; pH 9,2)

Pufr pro elektroforézu 10x TGS (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1% SDS (w/v); pH 8,3, *BIORAD*, USA)

Pufry využívané při hmotnostní spektrometrii

- nanášecí pufr (2% acetonitril, 0,1% kyselina trifluoroctová a destilovaná voda)
- mobilní fáze A (2% acetonitril, 0,1% kyselina mravenčí a voda)
- mobilní fáze B (80% acetonitril, 0,1% kyselina mravenčí)

Reakční pufr pro štěpení DNA enzymem *Microccocal Nuclease* (50 mM TrisHCl pH 8,0, 5 mM CaCl₂)

RIPA pufr s proteasovými a fosfatasovými inhibitory (150 mM NaCl; 1% NP-40; 0,5% deoxycholát sodný; 0,1% SDS; 50 mM Tris o pH 8,0)

Vzorkový pufr pro DNA elektroforézu: Blue/ Orange 6x Loading Dye (*Promega*, USA)

Vzorkový pufr Leammli pro SDS elektroforézu (2,4 ml 1M Tris o pH 6,8; 0,8 g SDS; 4 ml 100% glycerol; 0,01% bromfenolová modř; 1 ml merkaptoethanolu; 2,8 ml vody)

4.1.3.3. Enzymy

Micrococcal Nuclease 100 U/μl, *ThermoFisher Scientific* (USA)

4.1.3.4. Kity

- Kit pro ChIP: ChIP-IT® Express Enzymatic obsahující 10x Glycin; ChIP pufr 1 a 2; 1x Lyzační pufr; 10x PBS; Proteináza K 0,5 mg/ml; RNázaA 10 μg/μl; magnetické kuličky protein-G; pufr pro uvolnění zesíťení DNA s proteiny; roztok inhibující aktivitu Proteinázy K; Inhibiční roztok proteáz; Enzymatický koktejl; 5 M NaCl; 0,5M EDTA; AM2 pufr pro eluci imunoprecipitátů; 100 mM PMSF; 10x Hypotonický pufr (*Active Motif*, Belgie)
- Kit pro izolaci genomové DNA: Wizard® Genomic DNA Purification kit obsahující roztok pro rehydrataci DNA; roztok pro lýzi buněk; roztok pro lýzi buněčných jader; roztok pro precipitaci proteinů; roztok RNázyA (*Promega*, USA)
- Kit na kvantifikaci proteinů: Pierce® BCA Protein Assay kit obsahující BCA roztok A a B; standardní roztoky BSA (*ThermoFisher Scientific*, USA)

- Kit na imunoprecipitaci: Dynabeads™ Co-Immunoprecipitation Kit obsahující magnetické kuličky Dynabeads® M-270 Epoxy; pufrů C1, C2, HB, LB, SB, 5xIP, 5xLWB, EB; (*ThermoFisher Scientific*, USA)

4.2. Metody

4.2.1. Kultivace a pasážování buněk

Leukemické T-buňky byly kultivovány v inkubátoru při teplotě 37 °C, v atmosféře 5% CO₂ v RPMI 1640 médiu (*LONZA*, USA) obsahující antibiotika (100 jednotek penicilinu a 0,1 mg streptomycinu na 1 ml média) a 10% fetální hovězí sérum (*ThermoFisher Scientific*, USA). Buňky byly vždy pasážovány v takovém časovém rozmezí, aby jejich koncentrace nebyla vyšší než 700 000 – 800 000 buněk /ml.

4.2.2. Izolace chromatinu

Buňky byly pro experiment izolace chromatinu kultivovány tak, aby se jejich koncentrace pohybovala v rozmezí 500 000 – 700 000 buněk/ml. Na celý experiment bylo odebráno z kultivační láhve takové množství buněk, aby se jejich počet pohyboval v rozmezí 40-50 milionů. Při izolaci chromatinu byl využit protokol z kitu ChIP-IT® Express Enzymatic (*Active Motif*, Belgie). Po odebrání byly buňky centrifugovány (při 20 °C, 4 min na 400x g; ALC PK 110). Poté byla peleta buněk resuspendována v 10 ml roztoku 1xPBS (*Sigma Aldrich*, CZ) a buňky byly opět stočeny (při 20 °C, 4 min na 400x g; ALC PK 110). Následně byl odstraněn supernatant a k peletě buněk byl přidán roztok pro zesílení proteinů k DNA tj. 20 ml média BioWhittaker® RPMI 1640 (*LONZA*, USA) a 0,54 ml 37% formaldehydu (*Sigma Aldrich*, CZ) a po dobu 5 minut byl vzorek ponechán na třepačce při laboratorní teplotě. Po uplynutí doby byl vzorek stočen (při 20 °C, 3 min na 400x g; ALC PK 110) a vzniklý supernatant byl odstraněn a peleta buněk byla opět resuspendována v 10 ml roztoku 1xPBS (*Sigma Aldrich*, CZ). Po resuspendování byly buňky ihned stočeny (při 20 °C, 3 min na 400x g; ALC PK 110). Po stočení byl opět odstraněn supernatant a k peletě buněk byl přidán Glycin-Stop roztok tj. 8 ml dH₂O, 1 ml 10x PBS (*Active Motif*, Belgie) a 1ml 10x Glycin (*Active Motif*, Belgie). Buňky byly v tomto roztoku ponechány 5 minut na třepačce při laboratorní teplotě. Poté byly buňky stočeny (při 20 °C, 10 min na 500x g; ALC PK 110). Po stočení byla peleta buněk promyta a resuspendována v 1 ml roztoku 1xPBS

(*Sigma Aldrich*, CZ) a následně byly buňky stočeny (při 4 °C, 4 min na 400x g; centrifuga 5424R, Eppendorf). Poté byl pipetou odstraněn supernatant a peleta buněk byla resuspendována 1,5 ml lyzačního pufru (*Active Motif*, Belgie) obsahujícím 15 µl inhibitorů proteáz (*ThermoFisher Scientific*, USA). Následně byl vzorek inkubován 30 minut na ledu. Po uplynutí doby byl roztok buněk přenesen do Douncova homogenizátoru a 20x byl roztok buněk dezintegrován. Míra rozbití buněk byla kontrolována pod mikroskopem. Poté byl roztok s uvolněným buněčným obsahem stočen (při 4 °C, 30 sekund na 12 000x g; centrifuga 5424R, Eppendorf) a supernatant byl opatrně pipetou odstraněn. Získaná jádra buněk byla resuspendována v 350 µl reakčního pufru pro štěpení DNA enzymem *Micrococcal Nuclease* obsahujícím 3,5 µl inhibitorů proteáz (*ThermoFisher Scientific*, USA).

4.2.3. Enzymatické štěpení chromatinu

Vzorek získaných jader v pufru pro enzymatické štěpení enzymem *Micrococcal Nuclease* byl temperován po dobu 5 minut při 37 °C (Mixing Block MB-102). 1 µl enzymu *Micrococcal Nuclease* (*ThermoFisher Scientific*, USA) byl přidán do 99 µl 50% glycerolu (*Sigma Aldrich*, CZ). Do vzorku chromatinu bylo po jeho vytemperování na 37 °C přidáno 5 µl roztoku enzymu a obsažený chromatin byl štěpen po dobu 8 minut při této teplotě. Každé 2 minuty byl vzorek vortexován. Reakce byla zastavena přidáním 35 µl 0,2M EGTA (*Sigma Aldrich*, CZ). Vzorek byl následně chlazen 10 minut na ledě a poté stočen (při 4 °C, 10 min na 18 000x g; centrifuga 5424R, Eppendorf). Vzorek enzymaticky štěpeného chromatinu byl využit pro ChIP jak pomocí proteinu-G, tak i pomocí kuliček Dynabeads.

Před kontrolou míry enzymatického štěpení chromatinu bylo nutné uvolnit kovalentně navázané proteiny k DNA. K 50 µl vzorku chromatinu bylo přidáno 150 µl destilované vody a 10 µl 5M NaCl (*Sigma Aldrich*, CZ). Uvolnění zesíťení probíhalo při teplotě 65 °C přes noc. Následující den byl ke vzorku chromatinu přidán 1 µl RNázyA (*ThermoFisher Scientific*, USA) a s ní byl vzorek inkubován po dobu 15 minut. Po 15 minutách byly do vzorku přidány 2 µl Proteinázy K (*Sigma Aldrich*, CZ). Poté byl vzorek zahříván při 37 °C po dobu 60 minut. Po uplynutí doby byly do vzorku napipetovány při laboratorní teplotě 2 µl Stop Proteinázy K (*Active Motif*, Belgie). Takto získaná DNA byla využita pro identifikaci míry rozštěpení pomocí elektroforézy probíhající v 1,5% agarózovém gelu.

4.2.4. Izolace genomové DNA pro stanovení efektivity páru primerů

Při pasážování buněk bylo odebráno takové množství, aby jejich celkový počet pro tento experiment nepřekročil hodnotu 5 000 000 buněk. Pro izolaci genomové DNA byl využit protokol z kitu Wizard® Genomic DNA Purification (*Promega*, USA). Nejprve byla buněčná kultura stočena (při 20 °C, 4 min na 400x g; ALC PK 110). Následně byla peleta buněk resuspendována v 1 ml roztoku 1xPBS (*Sigma Aldrich*, CZ) a opět stočena (při 20 °C, 4 min na 400x g; ALC PK 110). Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a k buňkám bylo přidáno 600 µl roztoku vedoucího k lýze jader a 3 µl roztoku RNázy (oba *Promega*, USA). Vzorek byl inkubován 30 minut při teplotě 37 °C. Po uplynutí doby a zchlazení vzorku na laboratorní teplotu bylo k vzorku přidáno 200 µl roztoku způsobujícího precipitaci proteinů (*Promega*, USA). Po přidání tohoto roztoku byl vzorek krátce zvortexován a inkubován na ledě po dobu 5 minut. Následně byl vzorek centrifugován (při 4 °C, 4 min na 14 000x g; centrifuga 5424R, Eppendorf). Po centrifugaci byl supernatant přenesen do 600 µl isopropanolu (*Sigma Aldrich*, CZ). Vzorek byl v ruce promíchán a následně centrifugován (při 4 °C, 1 min na 14 000x g; centrifuga 5424R, Eppendorf). Poté byl supernatant odstraněn a k peletě buněk bylo napipetováno 600 µl 70% ethanolu (*Sigma Aldrich*, CZ). Vzorek byl opět v ruce promíchán a centrifugován (při 4 °C, 1 min na 14 000x g; centrifuga 5424R, Eppendorf). Následně byl ethanol odstraněn a peleta buněk resuspendována v 200 µl rehydratačního roztoku pro DNA (*Promega*, USA). Poté byl vzorek inkubován 60 minut při 65 °C. Nakonec byla změřena čistota a koncentrace vyizolované genomové DNA na spektrofotometru (*DENOVIX* Ds-11 FX+).

4.2.5. Příprava jaderného lyzátu

Pro přípravu jaderného lyzátu bylo odebráno takové množství buněk, aby v experimentu jejich počet nepřesáhl 15 000 000 buněk. Buňky byly stočeny (při 20 °C, 4 min na 400x g; ALC PK 110). Po stočení byla peleta buněk 2x resuspendována a promyta v 1 ml roztoku 1x PBS (*Sigma Aldrich*, CZ). Po promytí byl vzorek vždy stočen (při 4 °C, 4 min na 400x g; centrifuga 5424R, Eppendorf). Po posledním promytí byla peleta buněk resuspendována v 200 µl hypotonického pufru tj. 270 µl destilované vody a 30 µl 10x hypotonického pufru (*Active Motif*, Belgie) obsahujícím 2 µl proteázových inhibitorů (*ThermoFisher Scientific*, USA). Vzorky

resuspendované v hypotonickém pufru byly inkubovány na ledě po dobu 15 minut. Po uplynutí 15 minut bylo ke vzorku přidáno 10 μ l detergentu (*Sigma Aldrich*, CZ) a ihned promíchány pomocí pipety. Potom byly vzorky stočeny (při 4 °C, 4 min na 14000x g; centrifuga 5424R, Eppendorf). Po odstranění supernatantu bylo ke vzorku přidáno 50 μ l pufru RIPA s 0,5 μ l proteázových inhibitorů (*ThermoFisher Scientific*, USA) a 3 μ l benzonázy (*Merck*, Německo). Po inkubaci při 37 °C po dobu 1 minuty byly vzorky stočeny (při 4 °C, 10 min na 14000x g; centrifuga 5424R, Eppendorf). Získané jaderné lyzáty byly po stanovení koncentrace obsažených proteinů použity pro testování specifity protilátek.

4.2.5.1. Stanovení koncentrace proteinů v jaderném lyzátu

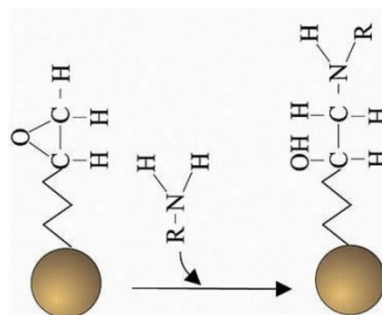
Ke stanovení proteinů ve vzorcích jaderného lyzátu byl využit kit na kvantifikaci proteinů BCA Protein Assay kit (*ThermoFisher Scientific*, USA). Stanovení koncentrace je v zásaditém prostředí založeno na redukci měďnatého iontu na měďný přítomnými proteiny a jeho následná chelatace kyselinou bicinchoninovou. Výsledný barevný komplex je detekován spektrofotometrem při vlnové délce 562 nm. Vzorky jaderného lyzátu před nanesením na mikrotitrační destičku byly naředěny 5x RIPA pufrem. Vzorky i standardní roztoky BSA byly nanášeny na destičku v množství 5 μ l a ke všem vzorkům bylo přidáno 200 μ l reakčního činidla tj. kyselina bicinchoninová a měďnaté ionty v poměru 50:1 (*ThermoFisher Scientific*, USA). Připravené vzorky po 30 minutové inkubaci při laboratorní teplotě byly změřeny na spektrofotometru (Synergy HT), kde byla pro jednotlivé vzorky stanovena absorbance. Ze standardní křivky byla následně vypočtena koncentrace přítomných proteinů ve vzorcích jaderných lyzátů.

4.2.6. Imunoprecipitace pomocí kuliček Dynabeads

4.2.6.1. Navázání protilátky na kuličky Dynabeads

Imunoprecipitace probíhala dle protokolu Dynabeads™ Co-Immunoprecipitation Kit a využitím všech jeho reagentů (*ThermoFisher Scientific*, USA). Na analytických vahách bylo do ependorfy naváženo 7,5 mg kuliček Dynabeads, jež jsou charakteristické přítomnou epoxydovou skupinou. Kuličky byly promyty 1 ml roztoku C1. Na magnetickém stojánku byl odstraněn roztok C1 a ke kuličkám bylo přidáno

375 μ l roztoku C1 obsahující protilátku. Protilátka byla připravena v roztoku C1 tak, aby výsledné množství protilátky bylo vždy 50 μ g a celkový objem 375 μ l. Nakonec bylo přidáno 375 μ l roztoku C2. Výsledný roztok o objemu 750 μ l obsahující kuličky Dynabeads a požadovanou protilátku byl inkubován přes noc na rotátoru při laboratorní teplotě. Mechanismus navázání protilátky na kuličky Dynabeads mající na svém povrchu epoxidovou skupinu je zobrazen na obr. 16. Následující den byl roztok na magnetickém stojánku odstraněn, kuličky byly nejprve promyty v 800 μ l HB pufru, poté v 800 μ l LB pufru a nakonec 3x v 800 μ l SB pufru. Po třetím přidání HB pufru byly kuličky inkubovány 15 minut na rotátoru při laboratorní teplotě. Po uplynutí doby byl na magnetickém stojánku roztok odsát a ke kuličkám bylo přidáno 750 μ l HB pufru a 7,5 μ l 2% azidu (*Amresco*, Francie).



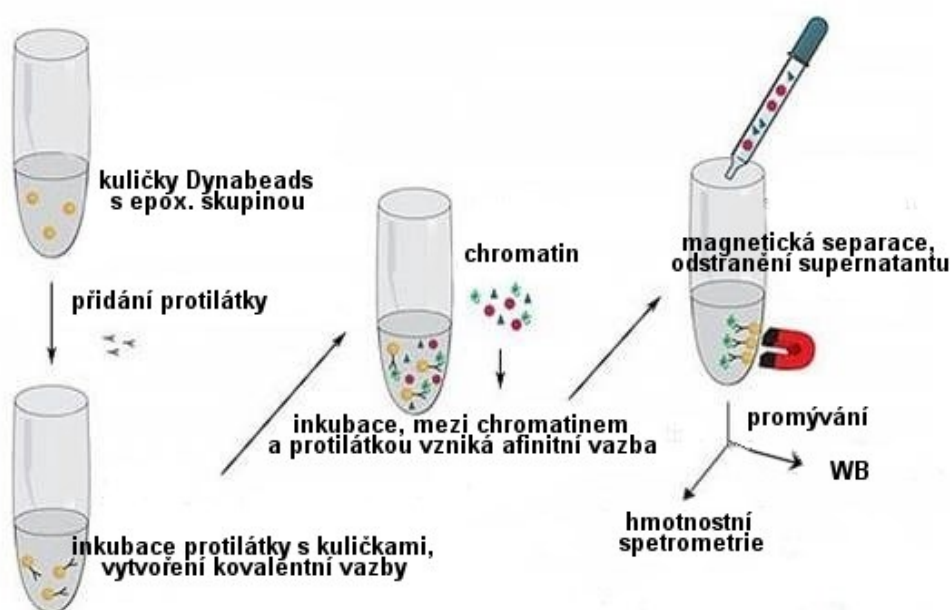
Obr. 16: Mechanismus navázání proteinu na magnetické kuličky Dynabeads přes jejich epoxidovou skupinu, která interaguje s aminoskupinou proteinu. Převzato a upraveno z (Internetové zdroje a databáze 4).

4.2.6.2. Postup imunoprecipitace pomocí kuliček Dynabeads s epoxidovou skupinou

Na magnetickém stojánku byl z kuliček odsát SB pufr sloužící pro jejich uchování v lednici. Následně byl z kuliček vymyt azid pomocí 900 μ l 0,1% roztoku BSA (*Serva*, Německo), ve kterém byly inkubovány po dobu 5 minut při laboratorní teplotě. Poté byly kuličky promyty 3x 900 μ l Extrakčního pufru. Po posledním promytí bylo ke kuličkám přidáno 50 μ l roztoku chromatinu v 850 μ l Extrakčního pufru. Ze vzorku chromatinu v extrakčním pufru bylo před přidáním ke kuličkám odebráno 20 μ l na detekci proteinu TEAD1 pomocí metody western blot (WB). Magnetické kuličky s přidáním chromatinem byly inkubovány při 4 °C 30 minut.

Po 30 minutové inkubaci byl roztok na magnetickém stojánku odstraněn, pouze 20 μ l z něj bylo uchováno na detekci WB. Poté byly magnetické kuličky 3x promyty v 900 μ l extrakčního pufru, následně 3x v 900 μ l 1x LWB pufru. Po promytí bylo

ke kuličkám napipetováno 200 μ l HPHEB pufru a vzorky byly inkubovány na rotátoru po dobu 20 minut při laboratorní teplotě. Po uplynutí doby byly kuličky umístěny na magnetický stojánek a z kuliček byl získán imunoprecipitát. Poté bylo ke kuličkám přidáno pouze 150 μ l HPHEB pufru a inkubace na rotátoru probíhala 10 minut při laboratorní teplotě. Na magnetickém stojánku bylo získáno další množství imunoprecipitátu. Získaný vzorek byl využit pro WB a pro hmotnostní spektrometrii. Schéma imunoprecipitace pomocí kuliček Dynabeads s epoxidovou skupinou je znázorněno na obr. 17.



Obr. 17: Schéma imunoprecipitace provedené pomocí kuliček Dynabeads na jejichž povrchu je epoxidová skupina. Převzato a upraveno z (Internetové zdroje a databáze 5).

4.2.7. Imunoprecipitace pomocí proteinu-G

Pro imunoprecipitaci pomocí proteinu-G byl využit protokol z ChIP-IT® Express Enzymatic Kit (*Active Motif*, Belgie), kde uvedené reagenty v tab. 1 se smíchaly naráz a poslední přidanou komponentou byla protilátka. Při tomto postupu byly využity magnetické kuličky s navázaným proteinem-G součástí zmíněného kitu (*Active Motif*, Belgie). Při druhém postupu byly využity kuličky Dynabeads s navázaným proteinem-G (*ThermoFisher Scientific*, USA), kdy nejprve byl chromatin inkubován 15 min s protilátkou, inhibitory proteáz (*ThermoFisher Scientific*, USA) a ChIP pufr 1 (*Active Motif*, Belgie). Až po 15 minutách bylo ke vzorku přidáno 25 μ l kuliček

Dynabeads (*ThermoFisher Scientific*, USA). V obou případech byl následující postup již shodný. Vzorky byly přes noc umístěny na rotátoru při 4 °C.

Tab. 1: Reagencie a jejich použitá množství pro imunoprecipitaci pomocí proteinu-G (*Active Motif*, Belgie)

Použité reagencie	Vzorek pro imunoprecipitaci (μl)
Chromatin	50
ChIP pufr 1	20
Inhibitory proteáz	1
Protilátka	výsledné množství = 3 μg / vzorek
kuličky s proteinem-G	25

Následující den byly kuličky nejprve stočeny (při 4 °C, 1 min na 400x g; centrifuga 5424R, Eppendorf). Poté byly kuličky separovány na magnetickém stojánku a promyty nejprve 1x 800 μl ChIP pufr 1 a poté 2x 800 μl ChIP pufr 2 (oba součásti kitu od *Active Motif*, Belgie). Po odstranění supernatantu byly magnetické kuličky resuspendovány v 50 μl AM2 pufru (*Active Motif*, Belgie). Naopak kuličky Dynabeads (*ThermoFisher Scientific*, USA) byly resuspendovány v 50 μl extrakčního pufru. Extrakce probíhala v obou případech 15 min na rotátoru při laboratorní teplotě. Po uplynutí doby byly vzorky centrifugovány (při 4 °C, 1 min na 400x g; centrifuga 5424R, Eppendorf) a ke vzorkům s magnetickými kuličkami byl přidán roztok vedoucí k uvolnění zesíťení proteinů od DNA v poměru 1:1 tj. 150 μl vody a 10 μl 5M NaCl (*Sigma Aldrich*, CZ). Na magnetickém stojánku byl získán supernatant, který byl do následujícího dne inkubován při 65 °C. Další den bylo ze vzorků odebráno 2x 20 μl na detekci TEAD1 pomocí metody WB a pomocí hmotnostní spektrometrie. Do zbylého množství vzorků byly přidány 2 μl proteinázy K (*Sigma Aldrich*, CZ) a jejich inkubace probíhala 60 minut při 37 °C). Působení proteinázy K (*Sigma Aldrich*, CZ) bylo po 60 minutách zastaveno 2 μl roztoku 100 mM PMSF (*Active Motif*, Belgie). Tyto získané vzorky byly použity na analýzu qPCR.

4.2.8. Elektroforetická gelová separace

4.2.8.1. Elektroforéza nukleových kyselin

Pro elektroforézu DNA byl využit 1,5% agarózový gel, který byl připraven rozpuštěním 0,75 g agarózy (*Lonza*, USA) v 50 ml 1x TAE pufru. Agaróza se v TAE

pufu rozpouštěla v mikrovlnné troubě po dobu 50 s. Do rozehrátého gelu byly přidány 4 µl GelRed Nuclei Acid Stain (*Biotium*, USA) a ještě vařící byl přenesen do předem vyvážené aparatury, kde gel ztuhnul.

K 15 µl vzorku DNA bylo přidáno 5 µl vzorkového pufu Blue/ Orange 6x Loading Dye (*Promega*, USA). K 5 µl standardu 100 bp DNA ladder (*Promega*, USA) byly přidány 3 µl vzorkového pufu (*Promega*, USA). Elektroforéza probíhala 70 minut při napětí 100 V v aparatuře Bio-Rad-Mini-Sub® Cell GT Cell vyplněné 300 ml 1xTAE pufem.

4.2.8.2. Separace proteinů pomocí SDS elektroforézy

Pro SDS elektroforézu řadí se mezi elektromigrační metody byly přichystány 2 gely: dělicí gel, v němž dochází k rozdělení jednotlivých proteinů a zaostřovací gel, kde se jednotlivé zóny vzorku zaostřují. Složení obou gelů je znázorněno v tab. 2. Elektroforéza byla prováděna v aparatuře Bio-Rad Mini-PROTEAN® Tetra cell naplněné 500 µl 1xTGS pufem (*BIORAD*, USA), Ke vzorkům získaným imunoprecipitací pomocí kuliček Dynabeads (s epoxidovou skupinou i s navázaným proteinem-G) i ke vzorkům jaderných lyzátů byl přidáván vzorkový pufr 4x Leammli tak, aby byl naředěn v poměru 1:4. Připravené vzorky byly povařeny při teplotě 95 °C po dobu 5 minut. Poté byly vzorky centrifugovány (při 20 °C, 30 sec na 14 000x g; centrifuga 5424R, Eppendorf) a naneseny na gel. Elektroforéza probíhala prvních 15 min při napětí 100 V a dalších 60 min při napětí 150 V.

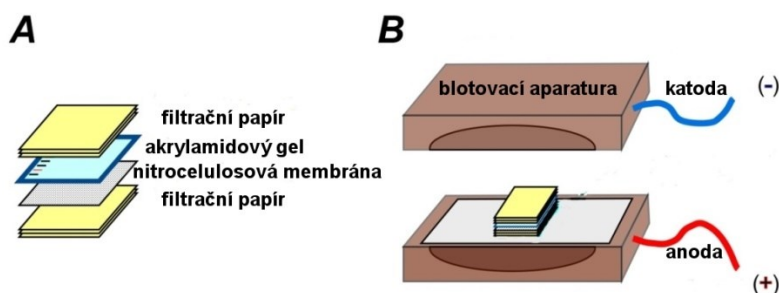
Tab. 2: Reagencie a jejich použitá množství při přípravě dělicího a zaostřovacího gelu pro SDS elektroforézu

reagencie	dělicí gel (ml)	zaostřovací gel (ml)
30% akrylamid	1,6700	0,4300
1,5 M Tris (pH 8.8)	1,2500	-
0,5 M Tris (pH 6.8)	-	0,3100
10% SDS	0,0500	0,0250
10% APS	0,0500	0,0250
TEMED	0,0025	0,0025
dH ₂ O	1,9800	1,7000

4.2.9. Přenos proteinu na nitrocelulosovou membránu

Přenos je známá metoda, jež se využívá nejen pro přenášení proteinů (WB), ale rovněž také pro DNA (Southern blot) či RNA (Northern blot). Po rozdělení proteinů pomocí SDS elektroforézy se proteiny přenáší z gelu na nitrocelulosovou membránu, a poté dochází k jejich vizualizaci prostřednictvím imunodetekce, při níž dochází k interakci primární a sekundární protilátky.

Pro přenos proteinů byla využita speciální aparatura Trans-blot® SD Semi-dry transfer cell. Ze dvou filtračních papírů, gelu a nitrocelulosové membrány byla vytvořena sendvičová struktura, jejíž uspořádání je znázorněné na obr. 18. Všechny komponenty sendvičového uspořádání byly předem namočené v přenosovém pufru. Přenos proteinů probíhal 60 minut při napětí 15 V.



Obr. 18: Schéma sendvičové struktury (A) a kompletní blotovací aparatury pro přenos proteinů na nitrocelulosovou membránu (B). Převzato a upraveno z (Internetové zdroje a databáze 6).

Po ukončení přenosu proteinů byla nitrocelulosová membrána blokována na třepačce Mixing Block MB-102 v 5 ml roztoku 5% mléka (*BIORAD*, USA) při laboratorní teplotě po dobu 45 minut. Po uplynutí doby blokování byla membrána promyta v 10 ml TTBS pufru. Poté byla membrána inkubována do dalšího dne v lednici při 4 °C v 5 ml roztoku 5% mléka (*BIORAD*, USA)/ BSA (*Serva*, Německo) obsahující 5 µl primární protilátky.

Druhý den byla membrána promyta 3x v 10 ml TTBS pufru po dobu 10 minut. Po promytí byla membrána ponechána na třepačce při laboratorní teplotě v 5 ml roztoku 1% mléka (*BIORAD*, USA) obsahujícího 2 µl sekundární protilátky po dobu 45 minut. Nakonec byla membrána promyta 3x v 10 ml TTBS pufru po dobu 5 minut a namočena 45 sekund v roztoku pro vizualizaci, který byl připraven smícháním roztoku

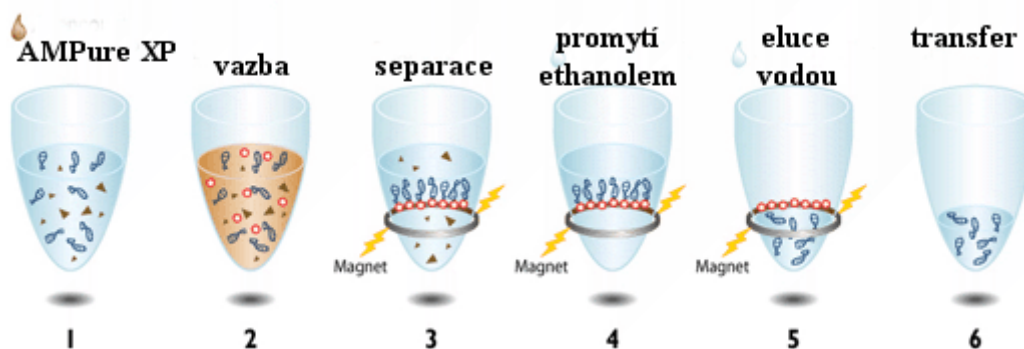
1 a 2. Množství použitých reagensů pro přípravu vizualizačního roztoku jsou uvedeny v tab. 3. Smícháním obou zmíněných roztoků vznikl chemiluminiscenční substrát, který reaguje s křenovou peroxidázou, jež je konjugovaná se sekundární protilátkou. Křenová peroxidáza přeměňuje chemiluminiscenční substrát na nestabilní produkt, který se stabilizuje tak, že vyžáří světlo. Toto vyzařené světlo bylo na membráně detekováno CCD kamerou (ChemiDocTMMP Imaging Systém).

Tab. 3: Reagencie a jejich použitá množství pro přípravu roztoku 1 a 2, jejichž smícháním vznikne roztok pro vizualizaci nitrocelulózové membrány.

reagencie	roztok 1 (ml)	roztok 2 (ml)
Luminol	-	10,000
Kyselina kumarová	-	0,044
0,1 M Tris (pH 8.8)	10,000	-
Roztok peroxidu vodíku	0,007	-

4.2.10. Přečištění vyimunoprecipitovaného vzorku před kvantitativní PCR

Ke vzorku získaného imunoprecipitací byl přidán 1,8 násobek jeho objemu kuliček AMPure XP (*Beckman Coulter*, CZ). Po přidání kuliček byl každý vzorek 10x promíchán nasátím a vysátím pipety a po promíchání byly vzorky inkubovány 5 minut při laboratorní teplotě. Při této inkubaci dochází ke specifickému navázání produktů o velikosti větší než 100 bp. Po uplynutí 5 minut byly vzorky umístěny na magnetický stojánek na dvě minuty, aby se dostatečně oddělily kuličky od zbylého roztoku. Poté byly kuličky promyty 2x 200 µl 70% etanolu (*Sigma Aldrich*, CZ), a kuličky byly po promytí sušeny 5 minut při laboratorní teplotě. Vzorky byly následně eluovány 50 µl Sigma vody (*Sigma Aldrich*, CZ). Tyto vzorky byly využity pro analýzu qPCR. Schéma čištění vzorků pomocí kuliček AMPure XP (*Beckman Coulter*, CZ), které vychytávají produkty o velikosti větší než 100 bp je znázorněno na obr. 19.



Obr. 19: Schéma průběhu čistění vzorků pomocí kuliček AMPure XP (Beckman Coulter, CZ). Převzato a upraveno z návodu výrobce, viz (Internetové zdroje a databáze 7).

4.2.11. Polymerázová řetězová reakce

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR) byla využita pro analýzu vzorků získaných chromatinovou imunoprecipitací. Jednotlivé páry primerů byly navrženy v databázi Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>) pro exon a enhancer genu *MYC* a pro enhancer genu *GLUT1* tak, aby každý pár primerů měl zastoupen CG páry mezi 50-60%, délku 20 párů bází a neobsahoval sekundární struktury ani netvořil dimery. Pro amplifikační účinnost byly páry navržených primerů testovány na genomové DNA. Pro testování účinnosti párů primerů byla připravena desítková ředící řada vyizolované genomové DNA a to tak, že každý následující vzorek byl 10x zředěn Sigma vodou (Sigma Aldrich, CZ) oproti původnímu. Účinnost amplifikace jednotlivých párů primerů byla vypočtena ze sklonu standardní křivky, která popisuje závislost hodnot C_T na koncentraci DNA. C_T značí hodnotu cyklu, ve kterém došlo k přeskočení fluorescence nad práh pozadí. Pomocí hodnoty sklonu standardní křivky byla vypočtena účinnost dle následujícího vzorce:

$$E = \left(10^{-\frac{1}{\text{slope}}} - 1 \right) \times 100$$

Na PCR destičku byly do jednotlivých jamek nanášeny vzorky tak, že vždy do jedné jamky bylo pipetováno 10,5 μl vzorku; 2 μl roztoku páru primerů tj. 80 μl Sigma vody, 10 μl Forward primeru a 10 μl Reverse primeru a 12,5 μl Master mix (BIORAD, USA). Destička se vzorky byla centrifugována (při 20 $^{\circ}\text{C}$, 30 sec na 400x g; centrifuga Concentrator Plus, Eppendorf) a poté vložena do přístroje CFX 96TM Real-Time System. PCR zahrnovalo iniciační zahřívání vzorků po dobu 30 s na 95 $^{\circ}\text{C}$, a poté

následovalo 40 cyklů zahřívání po dobu 5 s na 95 °C a 20 s při 60 °C. PCR bylo následováno měřením křivek tání, díky kterým byla určena specifita jednotlivých párů primerů.

4.2.12. Hmotnostní spektrometrie

Pro stanovení složení vzorku se využívá hmotnostní spektrometrie. Po ionizaci molekul vzorku dochází k dělení iontů podle poměru jejich náboje a hmotnosti. V našem případě byly pro hmotnostní spektrometrii využity kolony s reverzní fází (kolona EASY-Spray, 50 cm x 75 µm ID, PepMap C18, částice o velikosti 2 µm, velikost pórů 100 Å). Vzorky byly nejprve nanášeny na předkolonu (Acclaim PepMap300, C18, 5 µm, velikost pórů 300 Å, 300 µm x 5 mm, 5 kazet) po dobu 4 minut v množství 15 µl/min v nanášecím pufru. Jako mobilní fáze byly využity dva pufry (A a B). Peptidy byly eluovány 60 minutovým gradientem mobilní fáze B v rozmezí 2% - 40%. Následně byla kolona propláchnuta 70% fáze B po dobu 8 minut a na závěr 15 minut ekvilibrována fází A. Eluované kationty peptidu byly ionizovány pomocí elektrospreje a analyzovány na hmotnostním spektrometru Thermo Orbitrap Fusion. Analýzu dat pomocí softwaru MaxQuant 1.6.2.1 a Perseus 1.5.2.4 stejně jako samotné měření provedl v prvním případě vedoucí laboratoře RNDr. Petr Novák, PhD., ve druhém případě Mgr. Pavel Talacko z výzkumného týmu OMICS-Proteomika v Biocevu.

5. Výsledky a diskuse

Doposud nebyly u nádorové buněčné linie Jurkat pomocí metody ChIP-Seq identifikovány geny *GLUT1* a *MYC* jako cílové geny transkripčního faktoru TEAD1. Vzhledem k tomu, že se M-CAT vazebné motivy transkripčního faktoru TEAD1 nacházejí v místě transkripčně aktivního chromatinu u genů *GLUT1* a *MYC*, tak jsme se rozhodli provést chromatinovou imunoprecipitaci s následnou kvantifikací množství sekvencí nesoucí jednotlivé M-CAT motivy (ChIP-qPCR, Vališ *et al.*, 2016). Zmíněný postup byl proveden na buňkách linie Jurkat, což jsou buňky akutní lymfoblastické leukémie T-buněčné populace.

5.1. Vybrané páry primerů pro analýzu ChIP-qPCR

Pro geny *MYC* a *GLUT1* byly s využitím databáze Ensembl navrženy páry primerů, které byly poté testovány programem GeneRunner (<http://www.generunner.net/>) na tvorbu dimerů a přítomnost sekundárních struktur.

5.1.1. Pozice cílových sekvencí a oligonukleotidová sekvence navržených párů primerů pro gen *MYC*

Cílové sekvence navržených párů primerů genu *MYC* se nacházejí v enhanceru (v případě páru primerů ME) a v exonu tohoto genu (v případě páru primerů MP1), viz obr. 20. V tab. 4 je dále uvedena oligonukleotidová sekvence navržených párů primerů - ME, MP1, jež byly využity pro kvantifikaci metodou ChIP-qPCR.



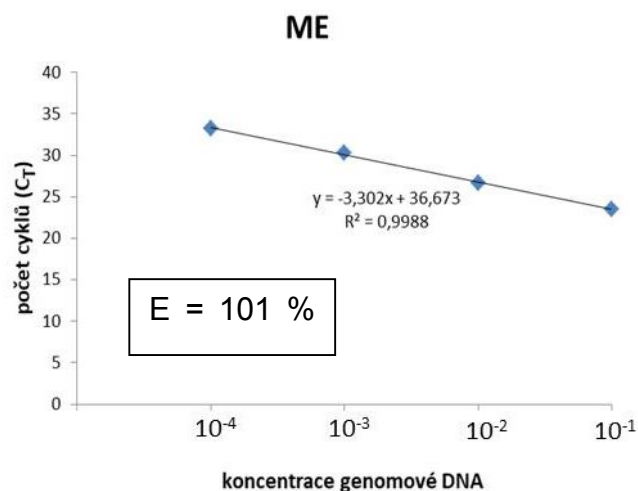
Obr. 20: Pozice cílových sekvencí genu *MYC* pro navržené primery (MP1 a ME). Převzato a upraveno z (Vališ *et al.*, 2016).

Tabulka 4: Oligonukleotidová sekvence navržených párů primerů, jejichž cílové sekvence se nacházejí v exonu a enhanceru genu *MYC*. f-forward, r-reverse, bp-páry bazí

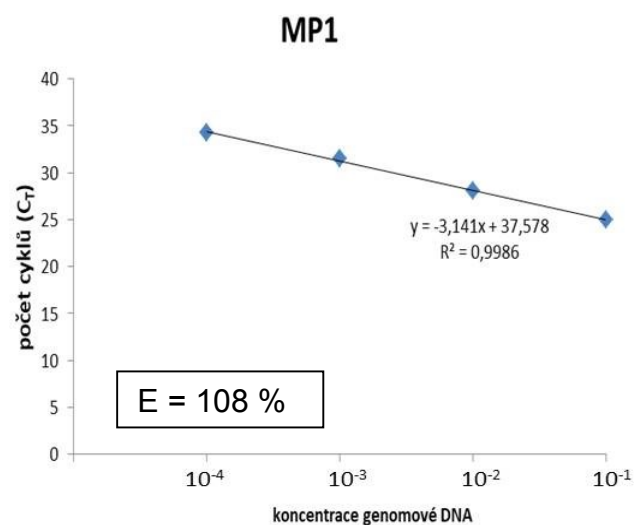
Primer	Sekvence (5'→3')	Velikost amplikonu (bp)
MP1 (f)	CTCTGAACGCGCGCCCATTA	48
MP1 (r)	CCAGGGAGAGTGGAGGAAAG	
ME (f)	TTGGTTGCTCCCCGCGTTTG	187
ME (r)	GAAAGGGGTGCGTGTATAGC	

5.1.1.1. Amplifikační efektivita a specifita navržených párů primerů pro gen *MYC*

Navržené páry primerů musely být nejprve otestovány na svou amplifikační efektivitu a specifitu. Pro výpočet amplifikační efektivity jednotlivých párů primerů byla zkonstruována standardní křivka, která byla získána vynesemím závislosti hodnoty cyklu, ve kterém fluorescence přesáhla prahovou hodnotu (C_T), na koncentraci genomové DNA. K výpočtu byl využit vzorec uvedený v kapitole 3.2.11. Získaná standardní křivka s vypočtenou amplifikační efektivitou je pro pár primerů ME zobrazena na obr. 21 a pro pár primerů MP1 na obr. 22. Testování amplifikační efektivity každého páru primerů probíhalo v technických triplicátech, kdy vždy průměrná hodnota C_T byla využita pro zkonstruování standardní křivky.

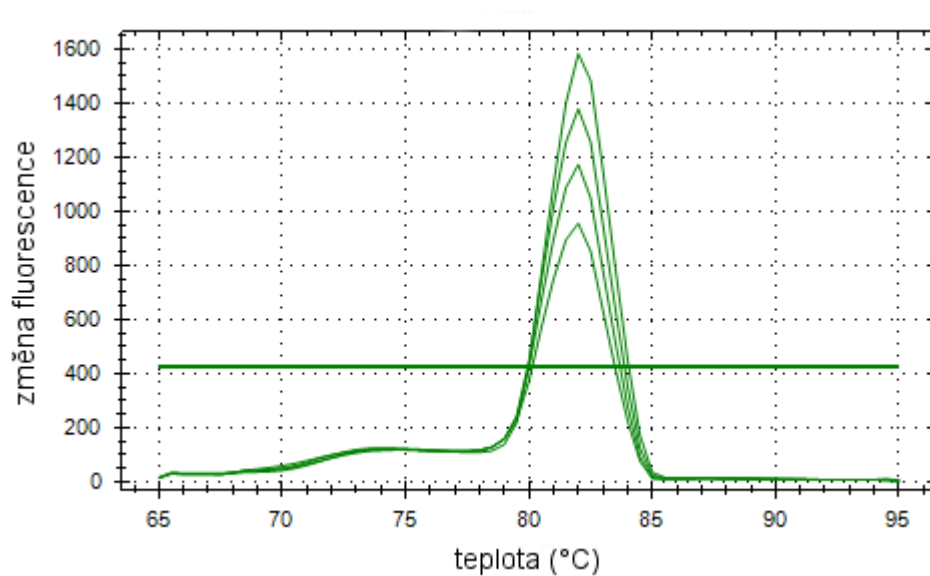


Obr. 21: Standardní křivka získaná vynesemím závislosti hodnot C_T na koncentraci genomové DNA, jejíž směrnice byla využita pro výpočet amplifikační efektivity pro pár primerů ME. Vypočtená efektivita je uvedena v rámečku.

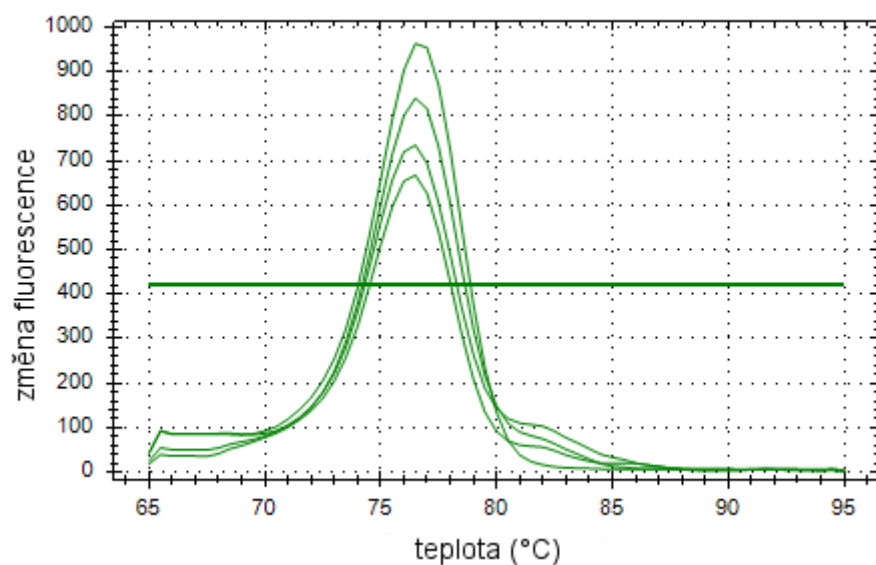


Obr. 22: Směrnice zkonstruované standardní křivky byla využita pro výpočet amplifikační efektivity, jejíž vypočtená hodnota je pro pár primerů MP1 uvedena v rámečku.

Ke zjištění skutečnosti, zda v průběhu qPCR reakce nevznikají nespecifické produkty, byly využity křivky tání. Pokud by během qPCR vznikaly nespecifické produkty lišící se obvykle teplotou tání, měly by křivky tání více než jeden vrchol. Křivky tání znázorňující čistě specifickou reakci pro pár primerů ME jsou zobrazeny na obr. 23 a pro pár primerů MP1 na obr. 24.



Obr. 23: Skutečnost, že každá křivka tání má pouze jeden vrchol potvrzuje, že navržený pár primerů ME je specifický.



Obr. 24: Křivky tání získané vynesemím změny fluorescence na teplotě dokazují, že qPCR reakce s využitím páru primerů MP1 probíhá specificky.

5.1.2. Pozice cílových sekvencí a oligonukleotidová sekvence navrženého páru primeru pro gen *GLUT1*

Cílové sekvence navrženého páru primerů GLUTE2 se nacházejí v enhanceru genu *GLUT1*, jejichž pozice je znázorněna na obr. 25. V tab. 5 je dále uvedena oligonukleotidová sekvence pro zmíněný navržený pár primerů genu *GLUT1*, který byl

stejně jako navržené páry primerů ME a MP1 použit pro kvantifikaci metodou ChIP-qPCR.



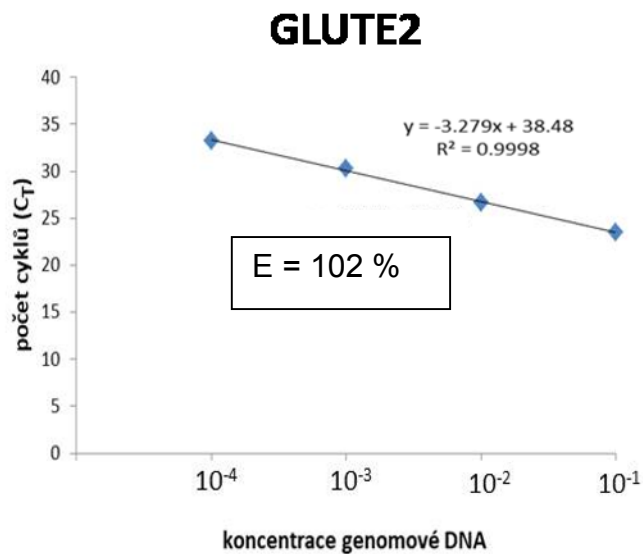
Obr. 25: Pozice cílových sekvencí genu *GLUT1* pro navržený pár primerů GLUTE2 nacházející se v enhanceru tohoto genu. V červeném kolečku jsou znázorněny M-CAT vazebné elementy transkripčního faktoru TEAD1. Převzato a upraveno z (Vališ *et al.*, 2016).

Tabulka 5: Oligonukleotidová sekvence navrženého páru primerů, jejichž cílové sekvence se nalézají v enhanceru genu *GLUT1*. f-forward, r-reverse, bp- páry bází

Primer	Sekvence (5'→3')	Velikost amplikonu (bp)
GLUTE2 (f)	GGTACAAGAGGGGATAGCAG	140
GLUTE2 (r)	CAAAACTGTCCTGCCTGGCC	

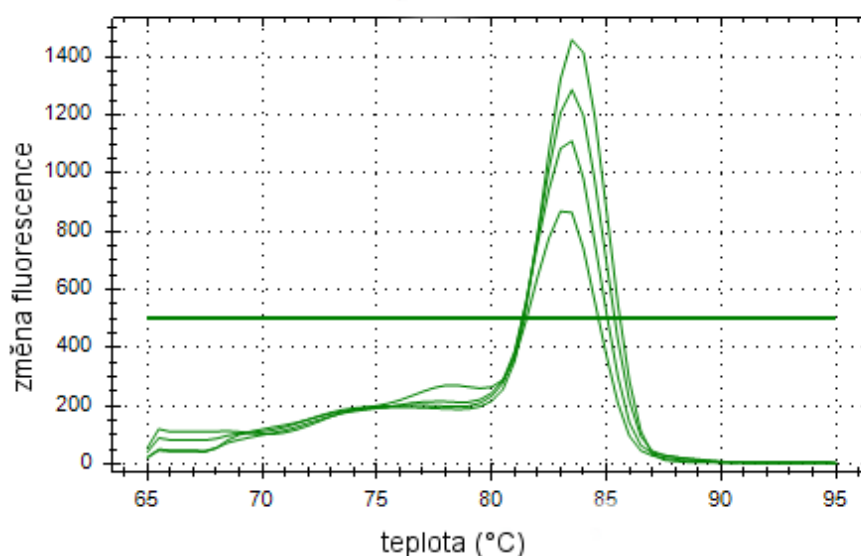
5.1.2.1. Amplifikační efektivita a specifita navrženého páru primeru pro gen *GLUT1*

Stejně jako v případě 4.1.1.1. bylo nutné navržený pár primerů rovněž otestovat na jeho amplifikační efektivitu a specifitu. Pro výpočet amplifikační efektivity byla i zde zkonstruována standardní křivka, jejíž směrnice byla využita pro výpočet amplifikační efektivity dle vzorce uvedeném v kapitole 3.2.11. I v tomto případě probíhalo testování amplifikační efektivity v technických triplikátech, kdy pro zkonstruování standardní křivky byla využita průměrná hodnota C_T . Standardní křivka získaná vynesemím hodnot C_T na koncentraci genomové DNA společně s vypočtenou hodnotou efektivity je pro pár primeru GLUTE2 znázorněna na obr. 26.



Obr. 26: Zobrazená standardní křivka a rovnice přímky, s pomocí jejíž směrnice byla vypočtena amplifikační efektivita pro pár primeru GLUTE2, viz hodnota uvedená v rámečku.

Křivky tání (obr. 23 a 24) znázorňují, že v průběhu qPCR reakce vznikl pouze jeden produkt, což potvrzuje, že navržené páry primerů jsou specifické. Stejně tak je tomu i v případě navrženého páru primerů pro gen *GLUT1* (GLUTE2), pro který jsou křivky tání dokumentovány na obr. 27.



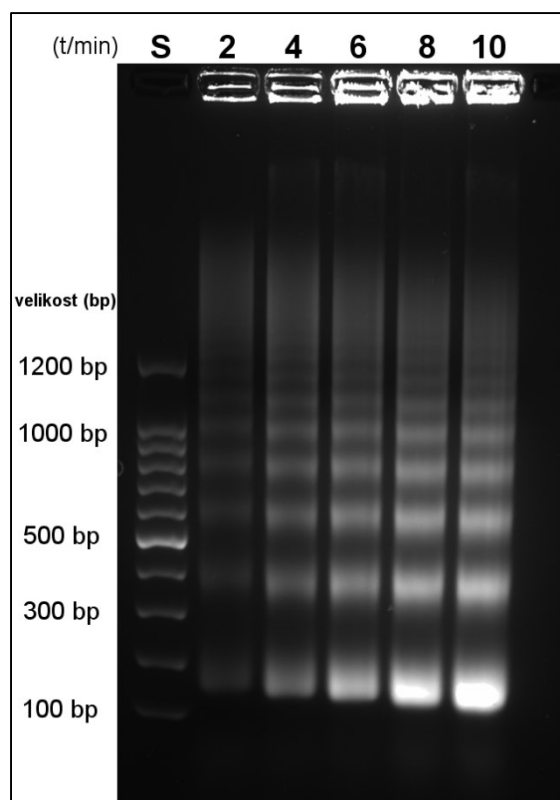
Obr. 27: Křivky tání dokazující specifitu páru primerů GLUTE2 byly získány vynesáním změny fluorescence na teplotě.

5.2. Chromatinová imunoprecipitace

Z buněčné linie Jurkat byl izolován chromatin za použití kitu CHIP-IT® Express Enzymatic (*Active Motif*, Belgie).

5.2.1. Optimalizace fragmentace chromatinu

Vyizolovaný chromatin z buněčné linie Jurkat byl štěpen působením enzymu *Micrococcal Nuclease* (*ThermoFisher Scientific*, USA). Před samotným provedením ChIP bylo nejdříve nutné optimalizovat čas enzymatické fragmentace chromatinu. Po iniciačním zahřívání na 37 °C byl k roztoku chromatinu přidán enzym. Z roztoku chromatinu byla po přidání enzymu v intervalu dvou minut odebírána 1/5 frakce, v níž bylo enzymatické štěpení zastaveno snížením teploty a přidáním 0,2M roztoku EGTA (*Sigma Aldrich*, CZ). Aby bylo možné pozorovat velikost štěpených fragmentů chromatinu, roztok chromatinu byl do následujícího dne zahříván na teplotu 65 °C, což způsobilo rozrušení formaldehydem zprostředkovaných kovalentních vazeb proteinů k DNA. Další den byly uvolněné proteiny v roztoku rozštěpeny Proteinázou K (*Sigma Aldrich*, CZ) a získané fragmenty DNA rozděleny elektroforézou probíhající v agarózovém gelu, viz obr. 28.

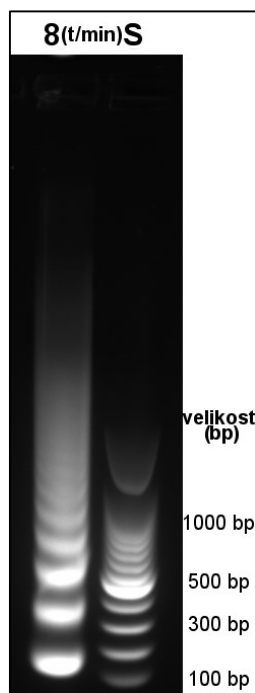


Obr. 28: Časová optimalizace štěpení chromatinu enzymem *Micrococcal Nuclease* (*ThermoFisher Scientific*, USA). Na agarózovém gelu jsou vyobrazeny velikosti fragmentů DNA, jež odpovídají velikosti nukleozómů. Enzymatické štěpení probíhalo po dobu 2, 4, 6, 8 a 10 minut. Jako standard (S) byl využit DNA marker 100 bp (*Promega*, USA). Enzymatické štěpení bylo ve všech případech zastaveno přidáním 0,2M roztoku EGTA (*Sigma Aldrich*, CZ) v poměru 1:9.

Z obr. 28 je vidět, že působením enzymu nedošlo ke štěpení veškeré přítomné DNA. Dále je pravděpodobné, že ačkoli by měla být dle postupu ve všech vzorcích stejná koncentrace DNA, nejspíše došlo k tomu, že v průběhu zesítnění proteinů k DNA se vytvořily masivní struktury, které nebyl enzym schopný rovnoměrně štěpit. Z tohoto důvodu je možné, že přestože bylo při optimalizaci odebíráno stále stejný objem roztoku chromatinu, nemuselo dojít k odebrání stejného dílu DNA.

Z výsledku pozorování časové optimalizace vyplývá, že většina fragmentů DNA dosahuje velikosti ≤ 1000 bp, a proto jsme se rozhodli dále používat čas štěpení enzymem *Micrococcal Nuclease* (*ThermoFisher Scientific*, USA) po dobu 8 minut. Tento vybraný čas působení enzymu byl použit pro fragmentaci chromatinu, který byl následně využit pro ChIP. Velikost štěpených fragmentů chromatinu byla stejně jako

na obr. 28 detekována po zahřátí na 65 °C po dobu 20 hodin a rozštěpení uvolněných proteinů Proteinázou K (*Sigma Aldrich*, CZ) při 37 °C, viz obr. 29.



Obr. 29: Fragmentace chromatinu štěpeného 8 minut enzymem *Micrococcal Nuclease* (*ThermoFisher Scientific*, USA) je detekována po inkubaci při 65 °C a po rozštěpení proteinů Proteinázou K (*Sigma Aldrich*, CZ). Velikost DNA fragmentů se pohybuje v rozmezí od 150 – 1000 bp. Jako standard (S) byl využit DNA marker 100 bp (*Promega*, USA).

Pro ChIP se ve většině případů používají fragmenty o velikosti v rozmezí 150 (200) – 600 bp (Cox *et al.*, 2018; Galli *et al.*, 2015). Je pravděpodobné, že fragmenty ≥ 1000 bp mohou snižovat efektivitu ChIP tím, že protilátka není schopná fragmenty DNA o velikosti ≥ 1000 pb s kovalentně vázanými proteiny vázat. Z tohoto důvodu by bylo potřeba oddělit fragmenty větší než 1000 bp například kapilární elektroforézou nebo vyzkoušet a optimalizovat fragmentaci chromatinu sonikací, která se k fragmentaci hojně využívá (Galli *et al.*, 2012; Zanonato *et al.*, 2015). V našem případě jsme se rozhodli pro štěpení enzymem *Micrococcal Nuclease* (*ThermoFisher Scientific*, USA), protože působení enzymu je šetrnější k epitopům a oproti sonikaci zachovává větší procento formaldehydem vytvořených kovalentních vazeb proteinů na DNA. Ty mohou být v případě sonikace rozrušeny teplotou.

Fragmentace chromatinu může být dále ovlivněna dobou reverzibilní fixace proteinů k DNA, a to působením formaldehydu (Hoffman *et al.*, 2015). V našem

případě probíhala fixace buněk v roztoku 1% formaldehydu (*Sigma Aldrich*, CZ) po dobu 5 minut, jiné postupy doporučují fixaci buněk ve stejném roztoku po dobu 10 minut, někdy i déle (Das *et al.*, 2004; Dasgupta and Chellappan, 2007; Zanconato *et al.*, 2015). I delší čas fixace může negativně ovlivnit efektivitu ChIP tím, že může zapříčinit ztrátu imunoprecipitovaného materiálu nebo deformaci konformace epitopů (Orlando, 2000). Z tohoto důvodu by bylo dále potřeba optimalizovat i dobu fixace formaldehydem a zjistit, zda je naše stanovená doba dostatečná k fixaci proteinu TEAD1 k DNA, a zda by delší nebo naopak kratší čas fixace nevedl k větší účinnosti ChIP.

5.2.2. ChIP pomocí kuliček Dynabeads s epoxidovou skupinou

Již dříve byla v naší laboratoři na lyzátu buněčných jader testována specifita protilátky TEAD1 š: 821705077 (*GeneTex*, USA). Specifitu protilátky dokazovala Ing. Jana Nováková, která potvrdila, že protilátka rozpoznává v denaturovaném stavu epitop proteinu TEAD1. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli zmíněnou protilátku využít na ChIP. Tato protilátka byla před provedením samotné ChIP kovalentně navázána na magnetické kuličky Dynabeads® M-270 Epoxy (*ThermoFisher Scientific*, USA), kdy 7,5 mg kuliček bylo nejprve inkubováno s 50 µg protilátky ve výsledném objemu 750 µl pufrů C1 a C2, jež byly součástí kitu Dynabeads™ Co-Immunoprecipitation (*ThermoFisher Scientific*, USA). K imunoprecipitaci jsme nejprve využili tento typ kuliček, protože při správném uchování se dají opakovaně použít. Tím se minimalizuje objem protilátky použité pro samotnou imunoprecipitaci.

5.2.2.1. Ověření ChIP pomocí hmotnostní spektrometrie

Protože naše laboratoř disponuje hmotnostním spektrometrem, využili jsme tento přístroj k analýze imunoprecipitátů na přítomnost proteinu TEAD1. Hmotnostní spektrometrie byla provedena pro vzorky získané imunoprecipitací protilátkou TEAD1 š: 821705077 (*GeneTex*, USA) a IgG Isotype control, š: 821800119 (*GeneTex*, USA). Imunoprecipitace byla provedena pro biologické duplikáty a jejich následnou analýzu provedl vedoucí laboratoře Strukturní biologie a buněčné signalizace RNDr. Petr Novák, PhD.

Bohužel v ani jednom imunoprecipitátu získaném protilátkou TEAD1 š: 821705077 (*GeneTex*, USA) nebyl protein TEAD1 identifikován. V tab. 6 je uvedeno

deset nejvíce přítomných proteinů v těchto vzorcích. Dohromady bylo hmotnostním spektrometrem identifikováno více než 1500 proteinů.

Tab. 6: Deset proteinů nejvíce zastoupených ve vzorcích imunoprecipátů protilátkou TEAD1 š: 821705077 (*GeneTex*, USA). Pořadí proteinů je znázorněno od nejvíce přítomného proteinu ve vzorku (pořadí 1-10). HSP – protein teplotního šoku

Pořadí proteinu	Identifikovaný protein	Molekulová hmotnost
1	Keratin (druhého typu)	65
2	Aktin	42
3	Tubulin α	50
4	Histone H2A	14
5	Tubulin β	50
6	Histon H4	12
7	Elongační faktor 1 α	50
8	Glyceraldehyd-3P-dehydrogenáza	36
9	Histone H2B	14
10	HSP 8	71

Pro porovnání jednotlivých proteinů vzorků imunoprecipátů protilátkou TEAD1 š: 821705077 (*GeneTex*, USA) a IgG Isotype control, š: 821800119 (*GeneTex*, USA) uvádím v tab. 7 deset nejvíce nabohacených proteinů ve vzorcích TEAD1 oproti negativní kontrole – IgG.

Tab. 7: Deset nejvíce nabohacených proteinů ve vzorcích získaných imunoprecipací protilátkou TEAD1 š: 821705077 (*GeneTex*, USA) oproti vzorkům IgG Isotype control, š: 821800119 (*GeneTex*, USA). Pořadí proteinů je znázorněno od nejvíce nabohaceného proteinu (pořadí 1–10), EDC: protein asociovaný s komplexem, který je potřebný pro odstranění 5-mythylguanosinové čepičky

Pořadí proteinu	Identifikovaný protein	Molekulová hmotnost
1	Versican	373
2	Těžký řetězec Dyneinu	471
3	EDC3	56
4	Jaderný proteiny TPR	267
5	CCR4-NOT transkripční komplex 1	267
6	Protein kontrolující poškození DNA	227
7	Buněčný diferenciační protein RCD1	33
8	EDC4	151
9	Runt-související transkripční faktor 1	49
10	Protein TFG	43

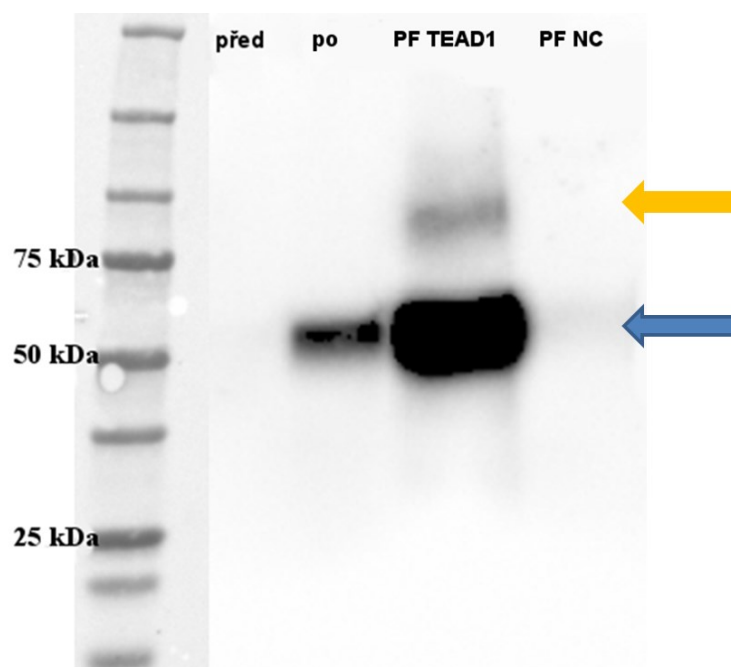
Z porovnání výsledků v tab. 6 a 7 je vidět, že nejvíce zastoupené proteiny vyskytující se ve vzorcích imunoprecipitátů protilátkou TEAD1 š: 821705077 (*GeneTex*, USA) se nachází i ve vzorcích získaných imunoprecipitací protilátkou IgG Isotype control, š: 821800119 (*GeneTex*, USA). Tyto proteiny se ani v jednom případě neshodují s proteiny, které byly nejvíce nabohacené v imunoprecipitátech TEAD1 oproti negativní kontrole.

Mezi další proteiny, které byly ve velké míře zastoupeny ve vzorcích imunoprecipitátů protilátkou TEAD1 š: 821705077 (*GeneTex*, USA), jsou mitochondriální proteiny a současně imunoglobulin typu IgG. Transkripční faktory, jako jsou např. TFIIIB nebo eukaryotický iniciační transkripční faktor A-III, byly identifikovány ve velmi malém množství.

Vzhledem k tomu, že jsme chtěli zjistit důvod, proč nebyl protein TEAD1 identifikován mezi ostatními, ve vzorku přítomnými proteiny, rozhodli jsme se monitorovat jednotlivé kroky imunoprecipitace pomocí metody WB.

5.2.2.2. Monitorování jednotlivých kroků ChIP pomocí metody WB

Analýza precipitace byla provedena metodou WB, během které byla ve vzorcích ověřena přítomnost proteinu TEAD1. Na výskyt proteinu TEAD1 byly testovány 4 vzorky. První vzorek pojmenovaný „před“ znázorňuje množství proteinu TEAD1, který byl společně s chromatinem izolován z buněk linie Jurkat. Jedná se o 1/45 vzorku, jehož zbylá část byla použita pro samotnou ChIP analýzu. Vzorek pojmenovaný „po“ detekuje protein TEAD1, který je přítomný v roztoku po proběhlé imunoprecipitaci (tj. poté, co se na kuličky s protilátkou TEAD1 š: 821705077 (*GeneTex*, USA) navázal protein TEAD1, jež je kovalentní vazbou přichycen k DNA). Zbylé dva testované vzorky na výskyt proteinu TEAD1 jsou precipitované frakce, (v obr. 30 uvedeny jako PF) získané protilátkou TEAD1 š: 821705077 (*GeneTex*, USA) a IgG Isotype control, š: 821800119 (*GeneTex*, USA). Detekce proteinů přítomných ve vzorcích, které byly nejprve elektroforézou rozděleny podle velikosti a následně přeneseny na nitrocelulózovou membránu, jsou detekovány pomocí chemiluminiscence na obr. 30.



Obr. 30: Detekce přítomnosti proteinu TEAD1 ve 4 vzorcích: vzorek „před“ znázorňuje 1/45 vzorku izolovaného chromatinu použitého pro ChIP protilátkou TEAD1 š: 821705077 (*GeneTex*, USA), vzorek „po“ ukazuje 1/44 zbylého vzorku po proběhlé imunoprecipitaci a zbylé dva vzorky představují 1/17 imunoprecipitátů protilátkou TEAD1 š: 821705077 (*GeneTex*, USA) a IgG Isotype control, š: 821800119 (*GeneTex*, USA, označeny jako PF). Pro detekci proteinů byla použita primární protilátka identická jako v případě imunoprecipitace protilátkou TEAD1: TEF-1 polyklonální králičí protilátka, š: 821705077 (*GeneTex*, USA) a sekundární kozí protilátka proti králičímu IgG (*Santa Cruz Biotechnology*, USA). Jako standard byl využit Precision Plus Protein Standards, All Blue (*BIORAD*, USA). Modrá šipka znázorňuje detekovaný protein o velikosti 50 kDa a žlutá o velikosti 90 kDa.

Z výsledku imunoblotu na obr. 30 je zřejmé, že ve vzorku izolovaného chromatinu z buněk linie Jurkat nebyl detekován protein TEAD1, který se použil pro ChIP. Pravděpodobně se nepodařilo s chromatinem izolovat protein TEAD1, nebo je jeho koncentrace v testovaném roztoku nízká a nedostatečná pro detekci. Dále pak není pravděpodobné, aby ve stejném vzorku byl po provedené ChIP vizualizován protein TEAD1 (na obr. 30 pojmenován „po“). Z tohoto důvodu podle všeho došlo k uvolnění protilátky z kuliček Dynabeads (*ThermoFisher Scientific*, USA), která je v tomto případě vizualizována použitou sekundární protilátkou. Uvolněná protilátka do roztoku je nežádoucí, protože maskuje epitop proteinu TEAD1. Tuto hypotézu potvrzují i výsledky hmotnostní spektrometrie, kdy byl ve vzorku označeném PF TEAD1 identifikován imunoglobulin IgG, viz obr. 30. Dále je chemiluminiscenčním způsobem

vizualizován i blíže nespecifický protein o velikosti 90 kDa, jenž byl detekován i pomocí hmotnostního spektrometru.

Mezi proteiny o velikosti 90 kDa, které byly ve vzorcích získaných ChIP protilátkou TEAD1 š: 821705077 (*GeneTex*, USA) identifikovány pomocí hmotnostního spektrometru, patří: hepatocytární růstový faktor (86 kDa), pre-mRNA-splicing faktor ATP-závislá RNA helikáza DHX15 (91 kDa), AP-1 komplex podjednotky gamma-1(91 kDa) nebo plasminogen (91 kDa).

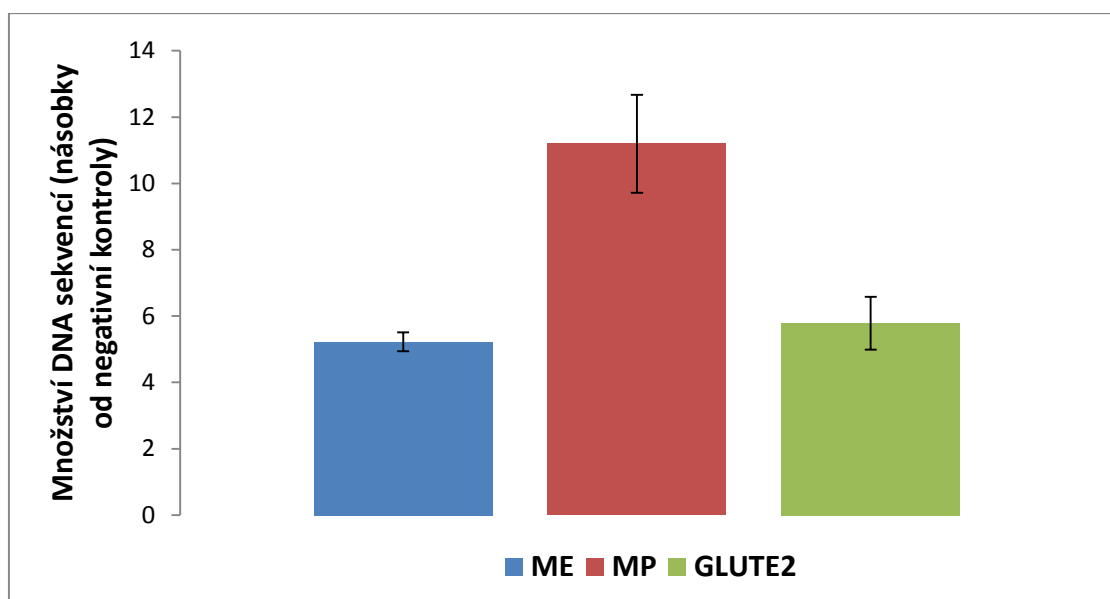
Důvodů, proč ve vzorcích nebyl protein TEAD1 přítomen, mohlo být několik. Pravděpodobně během námi zvolené doby fixace buněk 1% roztokem formaldehydu byly vytvořeny nespecifické shluky proteinů, včetně transkripčního faktoru TEAD1. Tyto shluky proteinů potom znemožnily rozpoznání epitopů proteinu TEAD1 protilátkou během imunoprecipitace (Orlando, 2000). Dalším důvodem mohla být destrukce protilátky TEAD1 během kovalentního uchycení ke kuličkám.

Kromě jaderných proteinů byly identifikovány i proteiny nacházející se v mitochondriích, což poukazuje na nespecifickou vazbu těchto proteinů ke kuličkám. Dále mohl být využit nepatrně odlišný způsob přípravy vzorků použitých pro chromatinovou imunoprecipitaci, kde precipitované proteiny jsou detekovány pomocí hmotnostní spektrometrie (ChIP-MS). Inspirací může být publikace, kde nejprve izolovali buněčná jádra a následně provedli zesílení proteinů k DNA pomocí roztoku formaldehydu. Tímto způsobem na buněčné linii octomilky obecné (Schneiderovy buňky) identifikovali interakce proteinů s komplexem letálních proteinů, jež jsou specifické pro mužské pohlaví (MSL, Wang *et al.*, 2013).

Vzhledem k tomu, že v našem případě byla nejspíš uvolněna protilátka TEAD1 š: 821705077 (*GeneTex*, USA) z kuliček, rozhodli jsme se pro ChIP využít jiný typ magnetických kuliček, a to konkrétně kuličky s proteinem-G.

5.2.3. ChIP s využitím magnetických kuliček s proteinem-G

V tomto případě byly k imunoprecipitaci použity magnetické kuličky s navázaným proteinem-G (*Active Motif*, Belgie) protilátka TEAD1 š: 821705077 (*GeneTex*, USA) a negativní kontrola – IgG Isotype control, š: 821800119 (*GeneTex*, USA). V rámci tohoto experimentu byla detekována vazba transkripčního faktoru TEAD1 do námi vybraných regionů u genů *MYC* a *GLUT1*. K detekci vazby transkripčního faktoru TEAD1 byla využita metoda ChIP-qPCR, jejíž vyhodnocení je znázorněné na obr. 31.



Obr. 31: Kvantifikace cílových sekvencí metodou ChIP-qPCR vedoucí ke zjištění, že transkripční faktor TEAD1 se váže do cílových míst genu *MYC* (promotoru i enhanceru) a *GLUT1* (enhanceru). V grafu jsou chybové úsečky znázorňující technické triplikáty. Počet biologických opakování: $n = 1$. ME – *MYC* enhancer, MP – *MYC* promotor, GLUTE2 – *GLUT1* enhancer.

Výsledky kvantifikace cílových sekvencí pomocí ChIP-qPCR (obr. 31), prostřednictvím které jsme zkoumali vazbu transkripčního faktoru TEAD1 do námi zvolených cílových sekvencí genů *MYC* a *GLUT1* znázorňují, že TEAD1 je přítomen v promotoru genu *MYC* i v enhancerech genů *MYC* a *GLUT1*.

Většina výzkumných skupin pro ChIP preferuje využívat magnetické kuličky obsahující na svém povrchu protein-G. Oproti kuličkám Dynabeads majících na svém povrchu epoxidovou skupinu, magnetické kuličky s proteinem-G k sobě váží protilátky skrze protein-proteinové interakce (Kato *et al.*, 1995). Vyjma proteinu-G je dále možné pro imunoprecipitaci využít protein-A, protein-L nebo fúzní protein A/G. Protein-G se od proteinu-A liší tím, že neváže pouze Fc fragmenty protilátek, ale i Fab fragmenty (Eliasson *et al.*, 1991). Dále se vzájemně odlišují afinitou k různým podtřídám imunoglobulinu IgG mezi jednotlivými živočišnými druhy (Choe *et al.*, 2016). Uvádí se, že nepatrně větší afinitu ke králičím protilátkám má protein-A, zatímco protein-G se hojně využívá pro purifikaci lidských a myších imunoglobulinů. My jsme využili magnetické kuličky s proteinem-G (*Active Motif*, Belgie), protože byly součástí námi používaného kitu pro imunoprecipitaci.

Některé výzkumné týmy zvyšují účinnost ChIP delší inkubací roztoku chromatinu s protilátkou, kdy je společně nechávají interagovat do následujícího dne při 4 °C. Tímto způsobem pravděpodobně zvyšují procento protilátky, které se naváže na epitop cílového proteinu. Následující den přidávají do roztoku magnetické kuličky s proteinem-A nebo G, které vyvazují Fc fragmenty imunoglobulinu (A. G. Cox *et al.*, 2018; Galli *et al.*, 2012).

Letos, v roce 2018, se na buňkách nádorové linie ryby *Danio rerio* (dánia pruhovaného, HuCCT1 a MSTO211H) podařilo odhalit vazbu transkripčního faktoru TEAD1 i jeho koaktivátoru YAP na stejné cílové sekvence enhanceru genu *GLUT1*. Nová skutečnost potvrzuje, že HSD má nemalý vliv i na regulaci buněčného metabolismu (Cox *et al.*, 2018).

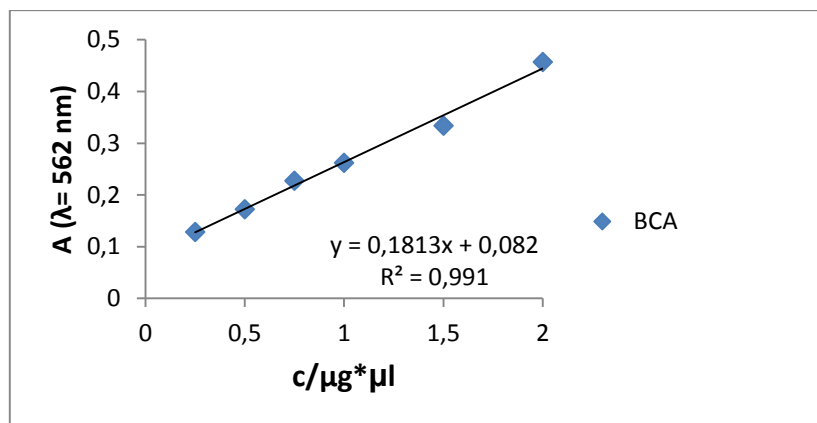
Spotřebované množství protilátky na jednu imunoprecipitaci prostřednictvím magnetických kuliček s proteinem-G (*Active Motif*, Belgie) je poměrně velké, a proto nebylo k dispozici dostatečné množství protilátky TEAD1 š: 821705077 (*GeneTex*, USA) na zopakování testu ChIP-qPCR. V našem případě byl pokus proveden pouze jednou a velikost amplikonů nebyla ověřena pomocí DNA elektroforézy probíhající v agarózovém gelu. Z tohoto důvodu nemůžeme s jistotou říci, že amplifikace skutečně proběhla specificky. Pro následující imunoprecipitaci jsme obdrželi od stejné firmy novou protilátku TEAD1 š: 821803774 (*GeneTex*, USA). Dodaná protilátka byla testována na vzorcích jaderného lyzátu na svou specifitu.

5.3. Testování specifity protilátky pro ChIP

Ověřování specifity protilátek probíhalo na vzorcích jaderných lyzátů. Nejprve byla pomocí BCA Protein Assay kitu (*ThermoFisher Scientific*, USA) stanovena koncentrace přítomných proteinů v těchto lyzátech.

5.3.1. Stanovení koncentrace proteinů ve vzorcích jaderných lyzátů

Separace jaderných lyzátů byla stejně jako izolace chromatinu provedena na buněčné linii Jurkat. Koncentrace přítomných proteinů ve vzorcích jaderných lyzátů byla vypočtena ze směrnice kalibrační přímky, jež byla získána vynesáním závislosti absorbance standardních roztoků BSA při vlnové délce 562 nm na jejich koncentraci. Kalibrační přímka i její rovnice je přiložena na obr. 32.



Obr. 32: Kalibrační křivka resp. směrnice rovnice přímky slouží pro výpočet koncentrace proteinů přítomných ve vzorcích jaderných lyzátů.

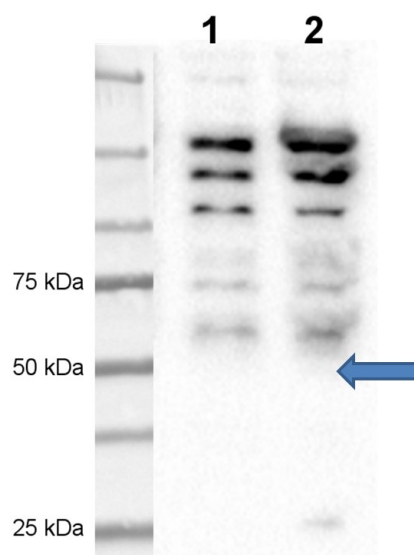
Koncentrace proteinů byla stanovena pro dva vzorky jaderných lyzátů (v tab. 8 uvedeny jako 1 a 2). Měření absorbance zmíněných vzorků probíhalo při vlnové délce 562 nm v duplikátech. Pro výpočet koncentrací proteinů obsažených ve vzorcích jaderných lyzátů byla využita průměrná hodnota změřených absorbancí, jejichž hodnoty jsou uvedeny v tab. 8.

Tab. 8: Změřené hodnoty absorbance vzorků jaderných lyzátů (1 a 2) při vlnové délce 562 nm a vypočtené koncentrace přítomných proteinů pro oba dva vzorky.

Jaderný lyzát	A (λ = 562 nm)	Průměr A	c (μg/μl)
1	0,296	0,297	5,929
	0,298		
2	0,341	0,335	6,977
	0,329		

5.3.2. Test protilátek na detekci proteinu TEAD1

První testovanou protilátkou na detekci byla TEAD1 š: 821705077 (*GeneTex*, USA). Detekce transkripčního faktoru TEAD1 probíhala pomocí imunoblotu na dvou vzorcích jaderných lyzátů. Pro testování bylo v obou případech nanášeno takové množství vzorku, aby výsledná koncentrace v něm obsažených proteinů byla 40 μg. Výsledek testu je znázorněn na obr. 33.

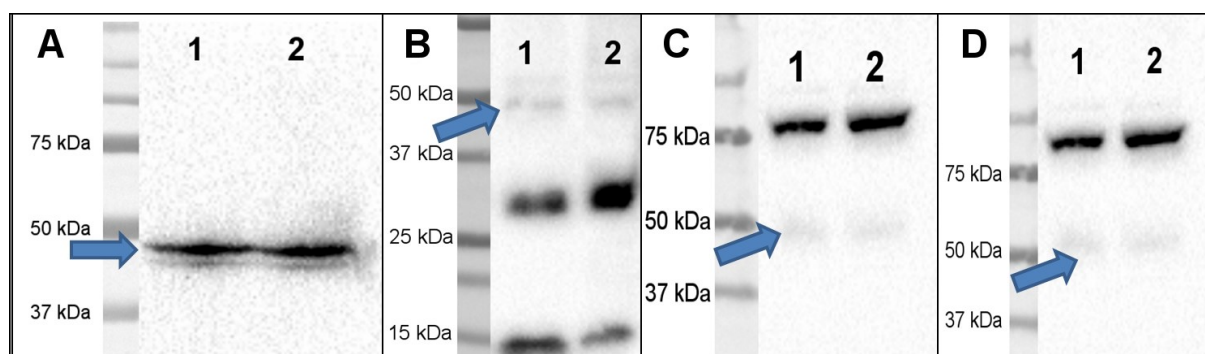


Obr. 33: Vizualizace proteinů obsažených ve vzorcích jaderného lyzátu 1 a 2, k níž byly využity následující protilátky: primární polyklonální králičí protilátka TEAD1, š: 821803774 (*GeneTex*, USA) a sekundární kozí protilátka proti králičímu IgG (*Santa Cruz Biotechnology*, USA). Jako standard byl využit Precision Plus Protein Standards, All Blue (*BIORAD*, USA). Šipka znázorňuje očekávanou pozici a velikost proteinu TEAD1 (50 kDa).

Z výsledku ověření specifity testované protilátky TEAD1, š: 821803774 (*GeneTex*, USA, obr. 33) je zřejmé, že tato protilátka není schopná rozpoznat protein TEAD1 v denaturovaném stavu. Velikost proteinu TEAD1 dle výrobce odpovídá velikosti 50 kDa použitého standardu, ale žádný detekovaný protein neodpovídá této velikosti. Na druhou stranu je rozpoznáno několik blíže nespecifických proteinů o velikosti v rozmezí 60 – 250 kDa. Z tohoto důvodu nebyla zkoušená protilátka TEAD1, š: 821803774 (*GeneTex*, USA) použita pro studium vazby transkripčního faktoru TEAD1 do cílových míst metabolických genů *MYC* a *GLUT1* pomocí metody ChIP-qPCR.

Následně byly na detekci proteinu TEAD1 zkoušeny jiné protilátky, které by se potencionálně daly použít pro ChIP. K testování byly využity následující protilátky: PanTEAD (D3F7L) monoklonální králičí protilátka, š: 13295S (*Cell Signalling*, USA) TEAD1 (D9X2L) králičí monoklonální protilátka, š: 12292S (*Cell Signalling*, USA), TEF-1 (133533) monoklonální králičí protilátka, š: GR3214408-2 (*Abcam*, UK) a TEF-1 (221367) polyklonální králičí protilátka, š: GR3241744-1 (*Abcam*, UK). I v tomto případě bylo testování provedeno na vzorcích jaderných lyzátů, viz tab. 8. Na jeden vzorek jaderného lyzátu byl nanesen takový objem, aby výsledné množství obsažených proteinů bylo 40 µg. Specifitu výše uvedených protilátek dokládají jimi

detekované proteiny rozdělené podle velikosti na nitrocelulosové membráně, viz obr. 34.



Obr. 34: Vizualizace proteinů obsažených ve vzorcích jaderných lyzátů 1 a 2, k níž byly použity následující primární protilátky: **A:** TEAD1 (D9X2L) š: 12292S (*Cell Signalling*, USA) **B:** TEF-1 (133533) š: GR3214408-2 (*Abcam*, UK) **C:** TEF-1 (221367) š: GR3241744-1 (*Abcam*, UK) a **D:** PanTEAD š: 13295S (*Cell Signalling*, USA). Ve všech čtyřech případech byla aplikována sekundární kozí protilátka proti králíčímu IgG (*Santa Cruz Biotechnology*, USA). Jako standard byl využit Precision Plus Protein Standards, All Blue (*BIO RAD*, USA). Šipkou je ve všech případech označen detekovaný protein TEAD1.

Na obr. 34 je vidět, že všechny zkoušené protilátky rozpoznávají cílový protein TEAD1, dále pak rozeznají i blíže neznámé proteiny o velikosti 75 a 80 kDa, a to v případě dvou protilátek: PanTEAD š: 13295S (*Cell Signalling* USA), TEF-1 (221367) š: GR3241744-1 (*Abcam*, UK). Protilátka, která na imunoblotu vizualizuje proteiny o nižší molekulové hmotnosti než námi hledaný protein TEAD1, je TEF-1 (133533) š: GR3214408-2 (*Abcam*, UK). Nejvíce specifickou protilátkou se jevila TEAD1 (D9X2L) š: 12292S (*Cell Signalling*, USA), protože jako jediná z výše testovaných protilátek detekovala pouze námi požadovaný protein TEAD1 o velikosti 50 kDa a žádný jiný.

Otázkou zůstává, jak výrobci připravují protilátku TEAD1, když doposud nebyl tento protein rekombinantním způsobem připraven. Nejpravděpodobnější je teorie, kdy se synteticky připravené peptidy proteinu TEAD1 použijí k imunizaci zvířete (Saper, 2009).

Před použitím protilátek pro ChIP by bylo vhodné zjistit, zda vůbec mohou rozpoznat a vázat nativní epitopy proteinů. Ve většině případů jsou totiž schopné rozeznat denaturované proteiny, které mají lineární epitopy. Zda protilátky detekují i

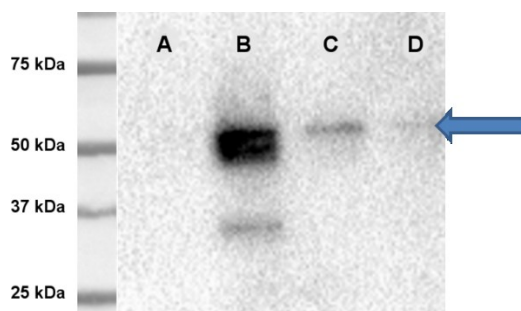
epitopy, které jsou v jiném prostorovém uspořádání, by bylo možné otestovat průtokovou cytometrií, metodou ELISA nebo ko-imunoprecipitací (Forsström *et al.*, 2015). Pokud není k dispozici taková protilátka, není možné ChIP provést (Horak and Snyder, 2002).

5.4. ChIP pomocí kuliček Dynabeads s navázaným proteinem-G

Pro imunoprecipitaci byly v tomto případě využity kuličky DynabeadsTM Protein-G 30 mg/mL invitrogen (*ThermoFisher Scientific*, USA). Vzhledem k faktu, že námi testované protilátky: PanTEAD (D3F7L), š: 13295S (*Cell Signalling*, USA), TEAD1 (D9X2L), š: 12292S (*Cell Signalling*, USA), TEF-1 (133533), š: GR3214408-2 (*Abcam*, UK) a TEF-1 (221367), š: GR3241744-1 (*Abcam*, UK) rozpoznávají protein TEAD1, viz obr. 34, byly všechny výše uvedené protilátky použity pro ChIP.

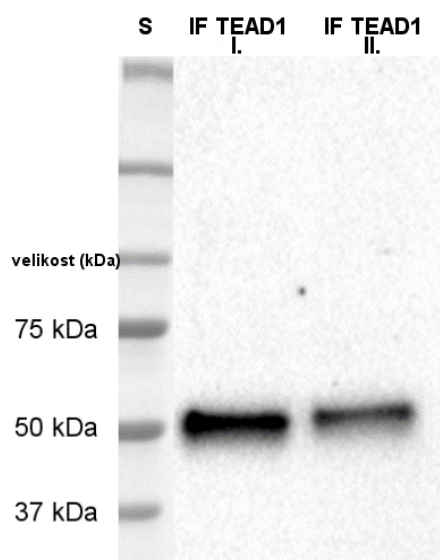
5.4.1. Ověření ChIP metodou WB

Analýza imunoprecipitátů protilátkami TEAD1 byla provedena metodou imunoblot, během které byla ve vzorcích ověřena přítomnost proteinu TEAD1. Na výskyt proteinu TEAD1 byly testovány čtyři vzorky, pro každou ChIP byla použita jiná protilátka. Výsledek metody WB je doložen na obr. 35.



Obr. 35: Ověření ChIP pomocí metody WB. Pro imunoprecipitaci byly použity následující protilátky: **A:** TEAD1 (D9X2L) š: 12292S (*Cell Signalling*, USA) **B:** TEF-1 (133533) š: GR3214408-2 (*Abcam*, UK) **C:** TEF-1 (221367) š: GR3241744-1 (*Abcam*, UK) a **D:** PanTEAD š: 13295S (*Cell Signalling*, USA). Pro detekci proteinů byla využita primární protilátka: TEF-1 monoklonální myší protilátka, š: 42037 (*Sigma Aldrich*, CZ) a sekundární koží protilátka proti myším IgG (*Santa Cruz Biotechnology*, USA). Šipka znázorňuje imunoprecipitovaný protein TEAD1 o velikosti 50 kDa. Jako standard byl využit Precision Plus Protein Standards, All Blue (*BIORAD*, USA).

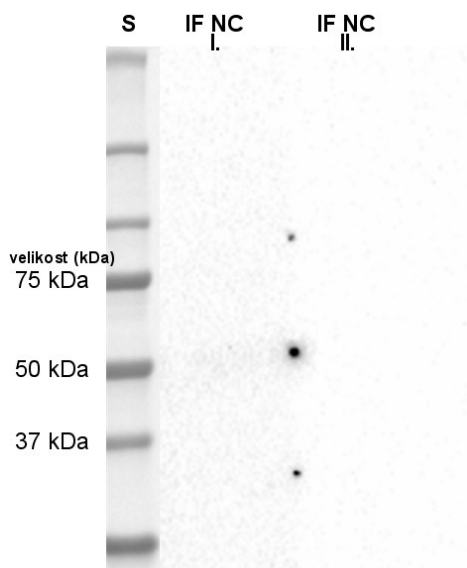
Pokud porovnáme použité protilátky pro ChIP a jejich specifitu rozpoznat protein TEAD1, na obr. 35 je vidět, že přestože byla protilátka TEAD1 (D9X2L) š: 12292S (*Cell Signalling*, USA) schopná rozeznat epitop proteinu v jeho denaturovaném stavu, viz obr. 34A, tak není schopná detekovat nativní epitop. Z výše zmíněného důvodu je pravděpodobné, že tato protilátka není vhodná na použití pro ChIP. Dále je zřetelné poměrně velké množství proteinu TEAD1 získaného imunoprecipitací protilátkou TEF-1 (133533) š: GR3214408-2 (*Abcam*, UK) a výrazně menší množství proteinu pokud je k imunoprecipitaci využita protilátka TEF-1 (221367) š: GR3241744-1 (*Abcam*, UK). Z tohoto důvodu byla pro příští imunoprecipitaci připravena směs kombinací těchto dvou protilátek TEF-1 š: GR3214408-2, GR3241744-1 (*Abcam*, UK). Pro imunoprecipitaci bylo použito 1,5 µg každé protilátky. Výsledek imunoprecipitace, kdy byly smíchány dvě zmíněné protilátky (*Abcam*, UK), je dokumentován na obr. 36.



Obr. 36: Ověření přítomnosti proteinu TEAD1 ve vzorcích imunoprecipátů směsí dvou protilátek: TEF-1 š: GR3214408-2, GR3241744-1 (*Abcam*, UK). Imunoprecipitace směsí protilátek TEAD1 proběhla ve dvou nezávislých opakováních, které jsou označeny jako IF I. a IF II. Na vizualizaci proteinu TEAD1 byla použita primární protilátka: TEF-1 monoklonální myší protilátka, š: 42037 (*Sigma Aldrich*, CZ) a sekundární kozí protilátka proti myšimu IgG (*Santa Cruz Biotechnology*, USA). Jako standard (S) byl využit Precision Plus Protein Standards, All Blue (*BIORAD*, USA). IF – imunoprecipitovaná frakce.

Jako negativní kontrolu imunoprecipitace jsme použili biologické duplikáty imunoprecipátů IgG Isotype control, š: 821800119 (*GeneTex*, USA), viz obr. 37. Abychom si byli skutečně jisti, že použitá protilátka pro imunoprecipitaci není uvolněna

do imunoprecipitované frakce, vzorky na obr. 36 a 37 byly analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie.



Obr. 37: Detekce proteinů přítomných ve vzorcích imunoprecipitátů IgG Isotype control, š: 821800119 (*GeneTex*, USA, NC), k níž byla využita primární protilátka:TEF-1 monoklonální myší protilátka, š: 42037 (*Sigma Aldrich*, CZ) a sekundární kozí protilátka proti myšimu IgG (*Santa Cruz Biotechnology*, USA). Imunoprecipitace proběhla ve dvou nezávislých opakováních (IF I. a IF II. ChIP). Jako standard byl využit Precision Plus Protein Standards, All Blue (*BIORAD*, USA). IF – imunoprecipitovaná frakce.

5.4.2. Ověření ChIP hmotnostní spektrometrií

Hmotnostní spektrometrie byla provedena pro vzorky získané imunoprecipitací směsí protilátek TEAD1 š: GR3214408-2, GR3241744-1 (*Abcam*, UK) a IgG Isotype control, š: 821800119 (*GeneTex*, USA), na obr. 36 a 37 znázorněny jako IF I. a IF II. Hmotnostní spektrometrii i následnou analýzu biologických duplikátů provedl Mgr. Pavel Talacko.

Bohužel ani v tomto případě nebyl v žádném ze vzorků získaných imunoprecipitací protilátkami TEAD1 š: GR3214408-2, GR3241744-1 (*Abcam*, UK) identifikován protein TEAD1. Celkově bylo nalezeno přibližně 700 proteinů. V tab. 9 je uvedeno deset proteinů nejvíce zastoupených v imunoprecipitovaných frakcích směsí protilátek TEAD1 (*Abcam*, UK).

Tab. 9: Deset proteinů nejvíce zastoupených ve vzorcích získaných imunoprecipitací směsí protilátek TEAD1 š: GR3214408-2, GR3241744-1 (*Abcam*, UK). Pořadí proteinů je znázorněno od nejvíce přítomného proteinu ve vzorku (pořadí 1 - 10)

Pořadí proteinu	Identifikovaný protein	Molekulová
1	Keratin	65
2	Konstantní část těžkého řetězce	36
3	Aktin	42
4	Desmoplakin	332
5	Podjednotka σ komplexu AP-1	19
6	Plakoglobin	82
7	Desmoglein	114
8	Vimentin	53
9	Protein podobný HSP	71
10	Tubulin α	50

Mezi další proteiny, které byly hodně zastoupeny ve vzorcích imunoprecipitátů TEAD1 jsou mitochondriální proteiny, metabolické enzymy, histony nebo imunoglobuliny typu IgG. Transkripční faktory byly identifikovány ve vzorcích identifikovány ve velmi malém množství.

Mezi deseti nejvíce přítomnými proteiny uvedenými v tab. 9 patří i podjednotka transkripčního faktoru AP-1. Tento výsledek potvrzuje objevenou interakci komplexu YAP/TEAD1/AP-1 z roku 2015, která je klíčová pro zahájení transkripce cílových genů (Zanconato *et al.*, 2015).

Pro porovnání jednotlivých proteinů přítomných ve vzorcích získaných ChIP protilátkou TEAD1 š: GR3214408-2, GR3241744-1 (*Abcam*, UK) a IgG Isotype control, š: 821800119 (*GeneTex*, USA) je uvedeno v tab. 10 deset nejvíce nabohacených proteinů ve vzorcích imunoprecipitátů zmíněnou protilátkou TEAD1 oproti negativní kontrole.

Tab. 10: Deset nejvíce nabohacených proteinů ve vzorcích získaných imunoprecipitací směsí protilátek TEAD1 š: GR3214408-2, GR3241744-1 (*Abcam*, UK) oproti negativní kontrole IgG Isotype control, š: 821800119 (*GeneTex*, USA). Pořadí proteinů je znázorněno od nejvíce nabohaceného proteinu (pořadí 1 - 10), G-M: Gephyrin;Molybdopterin

Pořadí proteinu	Identifikovaný protein	Molekulová hmotnost
1	Glukóza-6P-dehydrogenáza	60
2	Exportin-2	110
3	Faktor pro replikaci DNA – MCM7	81
4	G-M adenylyltransferáza	80
5	Glutamin-tRNA ligáza	87
6	Gelsolin	86
7	GMP reduktáza	38
8	Protein podobný proteinu TIP41	31
9	Protein centrosomu	113
10	Exportin-1	123

Z porovnání výsledků v tab. 9 a 10 je zřejmé, že nejvíce obsažené proteiny, které se vyskytují ve vzorcích imunoprecipitátů směsí protilátek TEAD1 (*Abcam*, UK) jsou proteiny, které se vyskytují i ve vzorcích, které byly získány imunoprecipitací negativní kontrolou IgG Isotype control, š: 821800119 (*GeneTex*, USA). Tyto proteiny se ani v jednom případě neshodují s proteiny, které byly nejvíce nabohacené ve vzorcích imunoprecipitátů TEAD1 proti vzorkům negativní kontroly. Dále, pokud porovnáme výsledky v tab. 6, 7, 9 a 10, je zřejmé, že proteiny, které se nejvíce vyskytují v imunoprecipitovaných frakcích protilátkami TEAD1 (*Abcam*, UK) se shodují ve třech proteinech z deseti. V tab. 9 je v porovnání s tab. 6 zastoupeno větší množství histonů. Mezi výsledky nejvíce nabohacených proteinů ve vzorcích imunoprecipitátů TEAD1 (*Abcam*, UK) není v porovnání s proteiny obsaženými ve vzorcích po imunoprecipitaci protilátkou negativní kontrolou IgG Isotype control, š: 821800119 (*GeneTex*, USA) žádná shoda, viz tab. 7 a 10.

Vzhledem k tomu, že nebyla potvrzena přítomnost proteinu TEAD1 ani v jednom vzorku, je pravděpodobné, že použité protilátky nejsou vhodné pro provedení ChIP. Na obr. 36 se dle výsledků hmotnostní spektrometrie nejedná o protein TEAD1, ale s vysokou pravděpodobností o těžký řetězec imunoglobulinu jako v případě obr. 30. I když k detekci byla použita primární myší protilátka TEAD1 š: 42037 (*Sigma Aldrich*, CZ), mohlo dojít ke zkřížené reaktivitě mezi jednotlivými živočišnými druhy. Z tohoto důvodu by bylo zřejmě lepší na vizualizaci proteinů použít místo HRP-konjugovaných sekundárních protilátek HRP-konjugovaný protein-A nebo G. Ty na rozdíl od HRP-

konjugovaných sekundárních protilátek interagují především s intaktní molekulou IgG (Lal *et al.*, 2005).

Bohužel v současné době nemáme k dispozici vhodnou protilátku TEAD1 pro ChIP, a tak nejlepším možným řešením je výroba vlastní protilátky TEAD1. To je z hlediska časového i finančního velmi náročné, a proto byla v této fázi experimentální části práce ukončena.

V budoucnu by bylo potřeba dále optimalizovat čas zesítnění proteinů k DNA roztokem formaldehydu a pro imunoprecipitaci použít takovou protilátku, která je skutečně vhodná pro ChIP, tj. rozeznává epitop proteinu TEAD1 v nativní formě. Pro hmotnostní spektrometrii by bylo dále vhodné optimalizovat množství kuliček použitých k imunoprecipitaci na množství použité protilátky TEAD1. Mohla totiž nastat situace, kdy k ChIP byl použit nadbytek kuliček s proteinem-G a současně malé množství protilátky. Z tohoto důvodu mohla být většina kuliček po provedení imunoprecipitace prázdných nebo na ně byly navázány blíže nespecifické proteiny, které byly identifikovány hmotnostní spektrometrií. Pokud se podaří vyrobit vhodnou protilátku TEAD1 pro ChIP a optimalizovat čas fixace formaldehydu, může se uvažovat o vytvoření DNA knihovny s následným sekvenováním nové generace (NGS). Tato kombinace metod umožní zjistit další regulované geny transkripčním faktorem TEAD1. Tyto informace by se poté mohly využít pro tvorbu protinádorových léčiv cílících transkripční faktor TEAD1 a jím regulované geny.

6. Závěr

V rámci této diplomové práce jsme se pokusili dokázat předpoklad, že transkripční faktor TEAD1 se u leukemických buněk linie Jurkat váže na transkripčně aktivní M-CAT vazebné elementy v enhanceru a promotoru genu *MYC* a enhanceru genu *GLUT1*. I přes skutečnost, kdy byly k imunoprecipitaci využity dva odlišné typy magnetických kuliček a několik protilátek TEAD1, tak se nepovedlo provést chromatinovou imunoprecipitaci transkripčního faktoru TEAD1. Naopak došlo k uvolnění protilátky TEAD1 do imunoprecipitované frakce. V současné době naše laboratoř nemá k dispozici funkční protilátku TEAD1, která by byla vhodná pro ChIP. V porovnání s odbornou literaturou jsme navrhli možné optimalizace našeho metodického postupu, jako jsou jiná doba fixace formaldehydem, využití sonikace k fragmentaci chromatinu, množství a typ kuliček použitých pro samotnou chromatinovou imunoprecipitaci. Optimalizace zmíněných postupů by v budoucnu mohla vést pomocí NGS k objevení dalších regulovaných genů transkripčním faktorem TEAD1.

7. Seznam použité literatury

- Anbanandam, A., Albarado, D.C., Nguyen, C.T., Halder, G., Gao, X. and Veeraraghavan, S. 2006. Insights into transcription enhancer factor 1 (TEF-1) activity from the solution structure of the TEA domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **103**: 17225–30. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0607171103
- Bantug, G.R., Galluzzi, L., Kroemer, G. and Hess, C. 2017. The spectrum of T cell metabolism in health and disease. *Nat. Publ. Gr.*, **18**: 19–34. Dostupné z: doi: 10.1038/nri.2017.99
- Boggiano, J.C., Vanderzalm, P.J. and Fehon, R.G. 2011. Tao-1 Phosphorylates Hippo/MST Kinases to Regulate the Hippo-Salvador-Warts Tumor Suppressor Pathway. *Dev. Cell*, **21**: 888–895. Dostupné z: doi:10.1016/j.devcel.2011.08.028
- Brand, K., Aichinger, S., Forster, S., Kupper, S., Neumann, B., Nürnberg, W. and Ohirsch, G. 1988. Cell-cycle-related metabolic and enzymatic events in proliferating rat thymocytes. *Eur. J. Biochem.*, **172**: 695–702. Dostupné z: doi: 10.1111/j.1432-1033.1988.tb13944.x
- Bürglin, T.R. 1991. The TEA domain: A novel, highly conserved DNA-binding motif. *Cell*, **66**: 11–12. Dostupné z: doi: 10.1016/0092-8674(91)90132-I
- Callus, B.A., Verhagen, A.M. and Vaux, D.L. 2006. Association of mammalian sterile twenty kinases, Mst1 and Mst2, with hSalvador via C-terminal coiled-coil domains, leads to its stabilization and phosphorylation. *FEBS J.*, **273**: 4264–4276. Dostupné z: doi: 10.1111/j.1742-4658.2006.05427.x
- Cao, X., Pfaff, S.L. and Gage, F.H. 2008. YAP regulates neural progenitor cell number via the TEA domain transcription factor. *Genes Dev.*, **22**: 3320–34. Dostupné z: doi: 10.1101/gad.1726608
- Cebola, I., Rodríguez-Seguí, S.A., Cho, C.H.-H., Bessa, J., Rovira, M., Luengo, M., Chhatriwala, M., Berry, A., Ponsa-Cobas, J., Maestro, M.A., Jennings, R.E., Pasquali, L., Morán, I., Castro, N., Hanley, N.A., Gomez-Skarmeta, J.L., Vallier, L. and Ferrer, J. 2015. TEAD and YAP regulate the enhancer network of human embryonic pancreatic progenitors. *Nat. Cell Biol.*, **17**: 615–626. Dostupné z: doi: 10.1038/ncb3160
- Chan, P., Han, X., Zheng, B., DeRan, M., Yu, J., Jarugumilli, G.K., Deng, H., Pan, D., Luo, X. and Wu, X. 2016. Autopalmitoylation of TEAD proteins regulates transcriptional output of the Hippo pathway. *Nat. Chem. Biol.*, **12**: 282–289. Dostupné z: doi: 10.1038/nchembio.2036
- Chen, L., Chan, S.W., Zhang, X., Walsh, M., Lim, C.J., Hong, W. and Song, H. 2010. Structural basis of YAP recognition by TEAD4 in the Hippo pathway. *Genes Dev.*, **24**: 290–300. Dostupné z: doi: 10.1101/gad.1865310
- Chen, Z., Friedrich, G.A. and Soriano, P. 1994. Transcriptional enhancer factor 1 disruption by a retroviral gene trap leads to heart defects and embryonic lethality in mice. *Genes Dev.*, **8**: 2293–301. Dostupné z: doi: 10.1101/gad.8.19.2293

- Choe, W., Durgannavar, T.A. and Chung, S.J. 2016. Fc-Binding Ligands of Immunoglobulin G: An Overview of High Affinity Proteins and Peptides. *Mater. (Basel)*, **9**. Dostupné z: doi: 10.3390/ma9120994
- Cox, A.G., Tsomides, A., Yimlamai, D., Hwang, K.L., Miesfeld, J., Galli, G.G., Fowl, B.H., Fort, M., Ma, K.Y., Sullivan, M.R., Hosios, A.M., Snay, E., Yuan, M., Brown, K.K., Lien, E.C., Chhangawala, S., Steinhauser, M.L., Asara, J.M., Houvras, Y., *et al.* 2018. Yap regulates glucose utilization and sustains nucleotide synthesis to enable organ growth. *EMBO J.*, **37**: e100294. Dostupné z: doi: 10.15252/embj.2018100294
- Das, P.M., Ramachandran, K., vanWert, J. and Singal, R. 2004. Chromatin immunoprecipitation assay. *Biotechniques*, **37**: 961–969. Dostupné z: doi: 10.2144/04376RV01
- Dasgupta, P. and Chellappan, S.P. 2007. Chromatin Immunoprecipitation Assays: molecular analysis of chromatin modification and gene regulation: *Methods Mol Bio*, **383**. 135–152. Dostupné z: doi: 10.1007/978-1-59745-335-6_9
- Davidson, I., Xiao, J.H., Rosales, R., Staub, A. and Chambon, P. 1988. The HeLa cell protein TEF-1 binds specifically and cooperatively to two SV40 enhancer motifs of unrelated sequence. *Cell*, **54**: 931–942. Dostupné z: doi: 10.1016/0092-8674(88)90108-0
- Delgado, M.D. and León, J. 2010. Myc roles in hematopoiesis and leukemia. *Genes Cancer*, **1**: 605–16. Dostupné z: doi: 10.1177/1947601910377495
- Dong, J., Feldmann, G., Huang, J., Wu, S., Zhang, N., Comerford, S.A., Gayyed, M.F., Anders, R.A., Maitra, A. and Pan, D. 2007. Elucidation of a universal size-control mechanism in Drosophila and mammals. *Cell*, **130**: 1120–33. Dostupné z: doi: 10.1016/j.cell.2007.07.019
- Eliasson, M., Andersson, R., Nygren, P.A. and Uhlén, M. 1991. Structural and functional analysis of the human IgG-Fab receptor activity of streptococcal protein G. *Mol. Immunol.*, **28**: 1055–61. Dostupné z: doi: 10.1016/0161-5890(91)90020-K
- Enzo, E., Santinon, G., Pocaterra, A., Aragona, M., Bresolin, S., Forcato, M., Grifoni, D., Pession, A., Zanconato, F., Guzzo, G., Bicciato, S. and Dupont, S. 2015. Aerobic glycolysis tunes YAP/TAZ transcriptional activity. *EMBO J.*, **34**: 1349-70. Dostupné z: doi: 10.15252/embj.201490379
- Farrance, I.K., Mar, J.H. and Ordahl, C.P. 1992. M-CAT binding factor is related to the SV40 enhancer binding factor, TEF-1. *J. Biol. Chem.*, **267**: 17234–40. Dostupné z: PMID: 1324927

- Forsström, B., Axnäs, B.B., Rockberg, J., Danielsson, H., Bohlin, A. and Uhlen, M. 2015. Dissecting antibodies with regards to linear and conformational epitopes. *PLoS One*, **10**: e0121673. Dostupné z: doi: 10.1371/journal.pone.0121673
- Frauwirth, K.A., Riley, J.L., Harris, M.H., Parry, R. V, Rathmell, J.C., Plas, D.R., Elstrom, R.L., June, C.H. and Thompson, C.B. 2002. The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism. *Immunity*, **16**: 769–77. Dostupné z: doi: 10.1016/S1074-7613(02)00323-0
- Galli, G.G., Carrara, M., Yuan, W.-C., Valdes-Quezada, C., Gurung, B., Pepe-Mooney, B., Zhang, T., Geeven, G., Gray, N.S., de Laat, W., Calogero, R.A. and Camargo, F.D. 2015. YAP Drives Growth by Controlling Transcriptional Pause Release from Dynamic Enhancers. *Mol. Cell*, **60**: 328–337. Dostupné z: doi: 10.1016/j.molcel.2015.09.001
- Galli, G.G., Honnens de Lichtenberg, K., Carrara, M., Hans, W., Wuelling, M., Mentz, B., Multhaupt, H.A., Fog, C.K., Jensen, K.T., Rappsilber, J., Vortkamp, A., Coulton, L., Fuchs, H., Gailus-Durner, V., Hrabě de Angelis, M., Calogero, R.A., Couchman, J.R. and Lund, A.H. 2012. Prdm5 regulates collagen gene transcription by association with RNA polymerase II in developing bone. *PLoS Genet.*, **8**: e1002711. Dostupné z: doi: 10.1371/journal.pgen.1002711
- Gupta, M.P., Kogut, P. and Gupta, M. 2000. Protein kinase-A dependent phosphorylation of transcription enhancer factor-1 represses its DNA-binding activity but enhances its gene activation ability. *Nucleic Acids Res.*, **28**: 3168–77. Dostupné z: PMID: 10931933
- Hardie, D.G. 2011. AMP-activated protein kinase--an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev.*, **25**: 1895–1908. Dostupné z: doi: 10.1101/gad.17420111
- Hoffman, E.A., Frey, B.L., Smith, L.M. and Auble, D.T. 2015. Formaldehyde crosslinking: a tool for the study of chromatin complexes. *J. Biol. Chem.*, **290**: 26404–11. Dostupné z: doi: 10.1074/jbc.R115.651679
- Horak, C.E. and Snyder, M. 2002. ChIP-chip: A genomic approach for identifying transcription factor binding sites. *Methods Enzymol.*, **350**: 469–483. Dostupné z: doi: 10.1016/S0076-6879(02)50979-4
- Hucl, T., Brody, J.R., Gallmeier, E., Iacobuzio-Donahue, C.A., Farrance, I.K. and Kern, S.E. 2007. High Cancer-Specific Expression of Mesothelin (*MSLN*) Is Attributable to an Upstream Enhancer Containing a Transcription Enhancer Factor-Dependent MCAT Motif. *Cancer Res.*, **67**: 9055–9065. Dostupné z: doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0474
- Iadevaia, V., Huo, Y., Zhang, Z., Foster, L.J. and Proud, C.G. 2012. Roles of the mammalian target of rapamycin, mTOR, in controlling ribosome biogenesis and protein synthesis. *Biochem. Soc. Trans.*, **40**: 168–172. Dostupné z: doi: 10.1042/BST20110682

- Iyer, N. V., Kotch, L.E., Agani, F., Leung, S.W., Laughner, E., Wenger, R.H., Gassmann, M., Gearhart, J.D., Lawler, A.M., Yu, A.Y. and Semenza, G.L. 1998. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev.*, **12**: 149–62. Dostupné z: PMID: 9436976
- Jacquemin, P., Hwangt, J.-J., Martial, J.A., Dollé, P. and Davidson, I. 1996. A Novel Family of Developmentally Regulated Mammalian Transcription Factors Containing the TEA/ATTS DNA Binding Domain*. *J. Biol. Chem.*, **271**: 21775–21785. Dostupné z: doi: 10.1074/jbc.271.36.21775
- Jacquemin, P., Sapin, V., Alsat, E., Evain-Brion, D., Dollé, P. and Davidson, I. 1998. Differential expression of the TEF family of transcription factors in the murine placenta and during differentiation of primary human trophoblasts in vitro. *Dev. Dyn.*, **212**: 423–436. Dostupné z: doi: 10.1002/(SICI)1097-0177(199807)212:3<423::AID-AJA10>3.0.CO;2-1
- Jiang, S.W., Dong, M., Trujillo, M.A., Miller, L.J. and Eberhardt, N.L. 2001. DNA binding of TEA/ATTS domain factors is regulated by protein kinase C phosphorylation in human choriocarcinoma cells. *J. Biol. Chem.*, **276**: 23464–70. Dostupné z: doi: 10.1074/jbc.M010934200
- Kaneko, K.J. and DePamphilis, M.L. 1998. Regulation of gene expression at the beginning of mammalian development and the TEAD family of transcription factors. *Dev. Genet.*, **22**: 43–55. Dostupné z: doi: 10.1002/(SICI)1520-6408(1998)22:1<43::AID-DVG5>3.0.CO;2-7
- Kaneko, K.J. and DePamphilis, M.L. 2013. TEAD4 establishes the energy homeostasis essential for blastocoel formation. *Development*, **140**: 3680–90. Dostupné z: doi: 10.1242/dev.093799
- Kaneko, K.J., Kohn, M.J., Liu, C. and DePamphilis, M.L. 2007. Transcription factor TEAD2 is involved in neural tube closure. *Genesis*, **45**: 577–87. Dostupné z: doi: 10.1002/dvg.20330
- Kato, K., Lian, L.Y., Barsukov, I.L., Derrick, J.P., Kim, H., Tanaka, R., Yoshino, A., Shiraishi, M., Shimada, I. and Arata, Y. 1995. Model for the complex between protein G and an antibody Fc fragment in solution. *Structure*, **3**: 79–85. Dostupné z: PMID: 7743134
- Kim, J., Tchernyshyov, I., Semenza, G.L. and Dang, C. V. 2006. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.*, **3**: 177–185. Dostupné z: doi: 10.1016/j.cmet.2006.02.002
- Kim, N.-G., Koh, E., Chen, X. and Gumbiner, B.M. 2011. E-cadherin mediates contact inhibition of proliferation through Hippo signaling-pathway components. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **108**: 11930–11935. Dostupné z: doi: 10.1073/pnas.1103345108
- Knight, J.F., Shepherd, C.J., Rizzo, S., Brewer, D., Jhavar, S., Dodson, A.R., Cooper, C.S., Eeles, R., Falconer, A., Kovacs, G., Garrett, M.D., Norman, A.R., Shipley, J. and Hudson, D.L. 2008. TEAD1 and c-Cbl are novel prostate basal cell markers that correlate with poor clinical outcome in prostate cancer. *Br. J. Cancer*, **99**: 1849–58. Dostupné z: doi: 10.1038/sj.bjc.6604774

- Lai, D., Ho, K.C., Hao, Y. and Yang, X. 2011. Taxol resistance in breast cancer cells is mediated by the hippo pathway component TAZ and its downstream transcriptional targets Cyr61 and CTGF. *Cancer Res.*, **71**: 2728–38. Dostupné z: doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2711
- Lal, A., Haynes, S.R. and Gorospe, M. 2005. Clean Western blot signals from immunoprecipitated samples. *Mol. Cell. Probes*, **19**: 385–8. Dostupné z: doi: 10.1016/j.mcp.2005.06.007
- Landin-Malt, A., Benhaddou, A., Zider, A. and Flagiello, D. 2016. An evolutionary, structural and functional overview of the mammalian TEAD1 and TEAD2 transcription factors. *Gene*, **591**: 292–303. Dostupné z: doi: 10.1016/j.gene.2016.07.028
- Landin Malt, A., Georges, A., Silber, J., Zider, A. and Flagiello, D. 2013. Interaction with the Yes-associated protein (YAP) allows TEAD1 to positively regulate NAIP expression. *FEBS Lett.*, **587**: 3216–3223. Dostupné z: doi: 10.1016/j.febslet.2013.08.013
- Lawlor, M.A., Alessi, D.R. 2001. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *Journal of Cell Sci*, **114**: 2903–10. Dostupné z: PMID: 11686294
- Lin, K.C., Park, H.W. and Guan, K.-L. 2017. Regulation of the Hippo Pathway Transcription Factor TEAD. *Trends Biochem. Sci.*, **42**: 862–872. Dostupné z: doi: 10.1016/j.tibs.2017.09.003
- Liu, F., Wang, X., Hu, G., Wang, Y. and Zhou, J. 2014. The transcription factor TEAD1 represses smooth muscle-specific gene expression by abolishing myocardin function. *J. Biol. Chem.*, **289**: 3308–16. Dostupné z: doi: 10.1074/jbc.M113.515817
- Liu, L., Das, S., Losert, W. and Parent, C.A. 2010. mTORC2 Regulates Neutrophil Chemotaxis in a cAMP- and RhoA-Dependent Fashion. *Dev. Cell*, **19**: 845–857. Dostupné z: doi: 10.1016/j.devcel.2010.11.004
- Liu, R., Lee, J., Kim, B.S., Wang, Q., Buxton, S.K., Balasubramanyam, N., Kim, J.J., Dong, J., Zhang, A., Li, S., Gupte, A.A., Hamilton, D.J., Martin, J.F., Rodney, G.G., Coarfa, C., Wehrens, X.H.T., Yechoor, V.K. and Moulik, M. 2017. Tead1 is required for maintaining adult cardiomyocyte function, and its loss results in lethal dilated cardiomyopathy. *JCI Insight*, **2**. Dostupné z: doi: 10.1172/jci.insight.93343
- Liu, Y., Wang, G., Yang, Y., Mei, Z., Liang, Z., Cui, A., Wu, T., Liu, C.-Y. and Cui, L. 2016. Increased TEAD4 expression and nuclear localization in colorectal cancer promote epithelial–mesenchymal transition and metastasis in a YAP-independent manner. *Oncogene*, **35**: 2789–2800. Dostupné z: doi: 10.1038/onc.2015.342
- Lopez-Anido, C., Poitelon, Y., Gopinath, C., Moran, J.J., Ma, K.H., Law, W.D., Antonellis, A., Feltri, M.L. and Svaren, J. 2016. Tead1 regulates the expression of *Peripheral Myelin Protein 22* during Schwann cell development. *Hum. Mol. Genet.*, **25**: ddw158. Dostupné z: doi: 10.1093/hmg/ddw158

- MacIver, N.J., Michalek, R.D. and Rathmell, J.C. 2013. Metabolic regulation of T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.*, **31**: 259–83. Dostupné z: doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-095956
- Mahoney, W.M., Hong, J.-H., Yaffe, M.B., Farrance, I.K.G. and Farrance, I.K.G. 2005. The transcriptional co-activator TAZ interacts differentially with transcriptional enhancer factor-1 (TEF-1) family members. *Biochem. J.*, **388**: 217–25. Dostupné z: doi: 10.1042/BJ20041434
- Manalo, D.J., Rowan, A., Lavoie, T., Natarajan, L., Kelly, B.D., Ye, S.Q., Garcia, J.G.N. and Semenza, G.L. 2005. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood*, **105**: 659–669. Dostupné z: doi: 10.1182/blood-2004-07-2958
- Meng, Z., Moroishi, T. and Guan, K.-L. 2016. Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes Dev.*, **30**: 1–17. Dostupné z: doi: 10.1101/gad.274027.115
- Meng, Z., Moroishi, T., Mottier-Pavie, V., Plouffe, S.W., Hansen, C.G., Hong, A.W., Park, H.W., Mo, J.-S., Lu, W., Lu, S., Flores, F., Yu, F.-X., Halder, G. and Guan, K.-L. 2015. MAP4K family kinases act in parallel to MST1/2 to activate LATS1/2 in the Hippo pathway. *Nat. Commun.*, **6**: 8357. Dostupné z: doi: 10.1038/ncomms9357
- Michalek, R.D., Gerriets, V.A., Jacobs, S.R., Macintyre, A.N., MacIver, N.J., Mason, E.F., Sullivan, S.A., Nichols, A.G. and Rathmell, J.C. 2011. Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4⁺ T cell subsets. *J. Immunol.*, **186**: 3299–303. Dostupné z: doi: 10.4049/jimmunol.1003613
- Mitani, A., Nagase, T., Fukuchi, K., Aburatani, H., Makita, R. and Kurihara, H. 2009. Transcriptional Coactivator with PDZ-binding Motif Is Essential for Normal Alveolarization in Mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **180**: 326–338. Dostupné z: doi: 10.1164/rccm.200812-1827OC
- Naye, F., Treguer, K., Soulet, F., Fauchaux, C., Fedou, S., Theze, N. and Thiebaud, P. 2007. Differential expression of two TEF-1 (TEAD) genes during *Xenopus laevis* development and in response to inducing factors. *Int. J. Dev. Biol.*, **51**: 745–752. Dostupné z: doi: 10.1387/ijdb.072375fn
- Noland, C.L., Gierke, S., Schnier, P.D., Murray, J., Sandoval, W.N., Sagolla, M., Dey, A., Hannoush, R.N., Fairbrother, W.J. and Cunningham, C.N. 2016. Palmitoylation of TEAD Transcription Factors Is Required for Their Stability and Function in Hippo Pathway Signaling. *Structure*, **24**: 179–186. Dostupné z: doi: 10.1016/j.str.2015.11.005
- Orlando, V. 2000. Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation. *Trends Biochem. Sci.*, **25**: 99–104. Dostupné z: PMID: 10694875
- Pan, D. 2007. Hippo signaling in organ size control. *Genes Dev.*, **21**: 886–897. Dostupné z: doi: 10.1101/gad.1536007

- Peng, C., Zhu, Y., Zhang, W., Liao, Q., Chen, Y., Zhao, X., Guo, Q., Shen, P., Zhen, B., Qian, X., Yang, D., Zhang, J.-S., Xiao, D., Qin, W. and Pei, H. 2017. Regulation of the Hippo-YAP Pathway by Glucose Sensor O-GlcNAcylation. *Mol. Cell*, **68**: 591–604.e5. Dostupné z: doi:10.1016/j.molcel.2017.10.010
- Pobbati, A. V and Hong, W. 2013. Emerging roles of TEAD transcription factors and its coactivators in cancers. *Cancer Biol. Ther.*, **14**: 390–8. Dostupné z: doi: 10.4161/cbt.23788
- Pollizzi, K.N. and Powell, J.D. 2014. Integrating canonical and metabolic signalling programmes in the regulation of T cell responses. *Nat. Rev. Immunol.*, **14**: 435–446. Dostupné z: doi: 10.1038/nri3701
- Praskova, M., Xia, F. and Avruch, J. 2008. MOBKL1A/MOBKL1B phosphorylation by MST1 and MST2 inhibits cell proliferation. *Curr. Biol.*, **18**: 311–21. Dostupné z: doi: 10.1016/j.cub.2008.02.006
- Ren, F., Zhang, L. and Jiang, J. 2010. Hippo signaling regulates Yorkie nuclear localization and activity through 14-3-3 dependent and independent mechanisms. *Dev. Biol.*, **337**: 303–12. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ydbio.2009.10.046
- Salceda, S. and Caro, J. 1997. Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J. Biol. Chem.*, **272**: 22642–7. Dostupné z: PMID: 9278421
- Santinon, G., Pocaterra, A. and Dupont, S. 2016. Control of YAP/TAZ Activity by Metabolic and Nutrient-Sensing Pathways. *Trend Cell Biol.*, **26**: 289-99. Dostupné z: doi: 10.1016/j.tcb.2015.11.004
- Saper, C.B. 2009. A guide to the perplexed on the specificity of antibodies. *J. Histochem. Cytochem.*, **57**: 1–5. Dostupné z: doi: 10.1369/jhc.2008.952770
- Sarbassov Dos D, D.D., Ali, S.M., Kim, D.-H., Guertin, D.A., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Sabatini, D.M. 2004. Rictor, a Novel Binding Partner of mTOR, Defines a Rapamycin-Insensitive and Raptor-Independent Pathway that Regulates the Cytoskeleton. *Curr. Biol.*, **14**: 1296–1302. Dostupné z: doi: 10.1016/j.cub.2004.06.054
- Sawada, A., Kiyonari, H., Ukita, K., Nishioka, N., Imuta, Y. and Sasaki, H. 2008. Redundant roles of Tead1 and Tead2 in notochord development and the regulation of cell proliferation and survival. *Mol. Cell. Biol.*, **28**: 3177–89. Dostupné z: doi: 10.1128/MCB.01759-07
- Sawada, A., Nishizaki, Y., Sato, H., Yada, Y., Nakayama, R., Yamamoto, S., Nishioka, N., Kondoh, H. and Sasaki, H. 2005. Tead proteins activate the Foxa2 enhancer in the node in cooperation with a second factor. *Development*, **132**: 4719–4729. Dostupné z: doi: 10.1242/dev.02059
- Schlegelmilch, K., Mohseni, M., Kirak, O., Pruszek, J., Rodriguez, J.R., Zhou, D., Kreger, B.T., Vasioukhin, V., Avruch, J., Brummelkamp, T.R. and Camargo, F.D. 2011. Yap1 acts downstream of α -catenin to control epidermal proliferation. *Cell*, **144**: 782–95. Dostupné z: doi: 10.1016/j.cell.2011.02.031

- Sekulić, A., Hudson, C.C., Homme, J.L., Yin, P., Otterness, D.M., Karnitz, L.M. and Abraham, R.T. 2000. A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase-AKT signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogen-stimulated and transformed cells. *Cancer Res.*, **60**: 3504–13. Dostupné z: PMID:10910062
- Semenza, G.L. 2009. Regulation of cancer cell metabolism by hypoxia-inducible factor 1. *Semin. Cancer Biol.*, **19**: 12–16. Dostupné z: doi: 10.1016/j.semcancer.2008.11.009
- Shaw, R.J., Kosmatka, M., Bardeesy, N., Hurley, R.L., Witters, L.A., DePinho, R.A. and Cantley, L.C. 2004. The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **101**: 3329–3335. Dostupné z: doi: 10.1073/pnas.0308061100
- Shi, Z., He, F., Chen, M., Hua, L., Wang, W., Jiao, S. and Zhou, Z. 2017. DNA-binding mechanism of the Hippo pathway transcription factor TEAD4. *Oncogene*, **36**: 4362–4369. Dostupné z: doi: 10.1038/onc.2017.24
- Shim, H., Dolde, C., Lewis, B.C., Wu, C.S., Dang, G., Jungmann, R.A., Dalla-Favera, R. and Dang, C. V. 1997. c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**: 6658–63. Dostupné z: PMID: 9192621
- Sun, Q., Chen, X., Ma, J., Peng, H., Wang, F., Zha, X., Wang, Y., Jing, Y., Yang, H., Chen, R., Chang, L., Zhang, Y., Goto, J., Onda, H., Chen, T., Wang, M.-R., Lu, Y., You, H., Kwiatkowski, D., *et al.* 2011. Mammalian target of rapamycin up-regulation of pyruvate kinase isoenzyme type M2 is critical for aerobic glycolysis and tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **108**: 4129–4134. Dostupné z: doi: 10.1073/pnas.1014769108
- Swartz, E.A., Johnson, A.D. and Owens, G.K. 1998. Two MCAT elements of the SM alpha-actin promoter function differentially in SM vs. non-SM cells. *Am. J. Physiol.*, **275**: C608-18. Dostupné z: PMID: 9688616
- Thaventhiran, J.E.D., Hoffmann, A., Magiera, L., de la Roche, M., Lingel, H., Brunner-Weinzierl, M. and Fearon, D.T. 2012. Activation of the Hippo pathway by CTLA-4 regulates the expression of Blimp-1 in the CD8+ T cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **109**: E2223-9. Dostupné z: doi: 10.1073/pnas.1209115109
- Tian, W., Yu, J., Tomchick, D.R., Pan, D. and Luo, X. 2010. Structural and functional analysis of the YAP-binding domain of human TEAD2. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **107**: 7293–7298. Dostupné z: doi: 10.1073/pnas.1000293107
- Tsika, R.W., Ma, L., Kehat, I., Schramm, C., Simmer, G., Morgan, B., Fine, D.M., Hanft, L.M., McDonald, K.S., Molkentin, J.D., Krenz, M., Yang, S. and Ji, J. 2010. TEAD-1 overexpression in the mouse heart promotes an age-dependent heart dysfunction. *J. Biol. Chem.*, **285**: 13721–35. Dostupné z: doi: 10.1074/jbc.M109.063057

- Vadla, R. and Haldar, D. 2018. Mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2) controls glycolytic gene expression by regulating Histone H3 Lysine 56 acetylation. *Cell Cycle*, **17**: 110–123. Dostupné z: doi: 10.1080/15384101.2017.1404207
- Vališ, K., Talacko, P., Grobárová, V., Černý, J. and Novák, P. 2016. Shikonin regulates C-MYC and GLUT1 expression through the MST1-YAP1-TEAD1 axis. *Exp. Cell Res.*, **349**: 273–281. Dostupné z: doi: 10.1016/j.yexcr.2016.10.018
- Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C. and Thompson, C.B. 2009. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science*, **324**: 1029–1033. Dostupné z: doi: 10.1126/science.1160809
- Wang, C.I., Alekseyenko, A.A., LeRoy, G., Elia, A.E.H., Gorchakov, A.A., Britton, L.-M.P., Elledge, S.J., Kharchenko, P. V, Garcia, B.A. and Kuroda, M.I. 2013. Chromatin proteins captured by ChIP-mass spectrometry are linked to dosage compensation in *Drosophila*. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **20**: 202–9. Dostupné z: doi: 10.1038/nsmb.2477
- Wang, Q. and Latham, K.E. 2000. Translation of maternal messenger ribonucleic acids encoding transcription factors during genome activation in early mouse embryos. *Biol. Reprod.*, **62**: 969–78. Dostupné z: PMID: 10727266
- Wang, W., Huang, J., Wang, X., Yuan, J., Li, X., Feng, L., Park, J.-I. and Chen, J. 2012. PTPN14 is required for the density-dependent control of YAP1. *Genes Dev.*, **26**: 1959–1971. Dostupné z: doi: 10.1101/gad.192955.112
- Wang, W., Li, X., Huang, J., Feng, L., Dolinta, K.G. and Chen, J. 2014. Defining the protein-protein interaction network of the human hippo pathway. *Mol. Cell. Proteomics*, **13**: 119–31. Dostupné z: doi: 10.1074/mcp.M113.030049
- Wang, Z., Wu, Y., Wang, H., Zhang, Y., Mei, L., Fang, X., Zhang, X., Zhang, F., Chen, H., Liu, Y., Jiang, Y., Sun, S., Zheng, Y., Li, N. and Huang, L. 2014. Interplay of mevalonate and Hippo pathways regulates RHAMM transcription via YAP to modulate breast cancer cell motility. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **111**: E89–E98. Dostupné z: doi: 10.1073/pnas.1319190110
- WARBURG, O. 1956. On the origin of cancer cells. *Science*, **123**: 309–14. Dostupné z: doi: 10.1126/science.123.3191.309
- Wilson, C.B., Rowell, E. and Sekimata, M. 2009. Epigenetic control of T-helper-cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.*, **9**: 91–105. Dostupné z: doi: 10.1038/nri2487
- Wise, D.R., DeBerardinis, R.J., Mancuso, A., Sayed, N., Zhang, X.-Y., Pfeiffer, H.K., Nissim, I., Daikhin, E., Yudkoff, M., McMahon, S.B. and Thompson, C.B. 2008. Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **105**: 18782–7. Dostupné z: doi: 10.1073/pnas.0810199105

- Wullschlegel, S., Loewith, R. and Hall, M.N. 2006. TOR Signaling in Growth and Metabolism. *Cell*, **124**: 471–484. Dostupné z: doi: 10.1016/j.cell.2006.01.016
- Xiao, J.H., Davidson, I., Ferrandon, D., Rosales, R., Vigneron, M., Macchi, M., Ruffenach, F. and Chambon, P. 1987. One cell-specific and three ubiquitous nuclear proteins bind in vitro to overlapping motifs in the domain Bi of the SV40 enhancer. *EMBO J.*, **6**: 3005–3013. Dostupné z: PMID: 2826126
- Xu, M.Z., Chan, S.W., Liu, A.M., Wong, K.F., Fan, S.T., Chen, J., Poon, R.T., Zender, L., Lowe, S.W., Hong, W. and Luk, J.M. 2011. AXL receptor kinase is a mediator of YAP-dependent oncogenic functions in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, **30**: 1229–1240. Dostupné z: doi: 10.1038/onc.2010.504
- Yoshida, T. 2008. MCAT elements and the TEF-1 family of transcription factors in muscle development and disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **28**: 8–17. Dostupné z: doi: 10.1161/ATVBAHA.107.155788
- Zanconato, F., Forcato, M., Battilana, G., Azzolin, L., Quaranta, E., Bodega, B., Rosato, A., Bicciato, S., Cordenonsi, M. and Piccolo, S. 2015. Genome-wide association between YAP/TAZ/TEAD and AP-1 at enhancers drives oncogenic growth. *Nat. Cell Biol.*, **17**: 1218–1227. Dostupné z: doi: 10.1038/ncb3216
- Zhang, H., Liu, C.-Y., Zha, Z.-Y., Zhao, B., Yao, J., Zhao, S., Xiong, Y., Lei, Q.-Y. and Guan, K.-L. 2009. TEAD transcription factors mediate the function of TAZ in cell growth and epithelial-mesenchymal transition. *J. Biol. Chem.*, **284**: 13355–62. Dostupné z: doi: 10.1074/jbc.M900843200
- Zhang, H., Pasolli, H.A. and Fuchs, E. 2011. Yes-associated protein (YAP) transcriptional coactivator functions in balancing growth and differentiation in skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **108**: 2270–5. Dostupné z: doi: 10.1073/pnas.1019603108
- Zhao, B., Li, L., Tumaneng, K., Wang, C.-Y. and Guan, K.-L. 2010. A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF(beta-TRCP). *Genes Dev.*, **24**: 72–85. Dostupné z: doi: 10.1101/gad.1843810

Internetové zdroje a databáze:

1. *Národní onkologický program Linkos*, 2018 [online], [cit. 25. 11. 2018]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/narodni-onkologicky-program/co-musite-vedet/ceska-republika-a-rakovina-v-cislech/>
2. *Univerzální Proteinová databáze Uniprot*, 2017 [online]. Nucleic Acids Res. 45: D158-D169 (2017). [cit. 02. 12. 2018]. Dostupné z: <https://www.uniprot.org>
3. *Volně přístupná databáze vazebných sekvencí transkripčních faktorů JASPAR*, 2018 [online]. Nucleic Acids Res. 46: D260-D266 (2018). [cit. 02. 12. 2018]. Dostupné z: <https://www.jaspar.genereg.net>

4. *Kuličky Dynabeads obsahující na svém povrchu epoxidovou skupinu*, ThermoFisher Scientific 2018 [online], [cit. 25. 11. 2018]. Dostupné z:
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/1430>
5. *Postup imunoprecipitace pomocí kuliček Dynabeads s epoxidovou skupinou*, ThermoFisher Scientific 2018 [online], [cit. 25. 11. 2018]. Dostupné z:
<https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-assays-analysis/immunoprecipitation/surface-activated-dynabeads-magnetic-beads.html>
6. *Blotovací aparatura pro přenos proteinů na membránu*, Protocol Exchange 2018 [online], [cit. 25. 11. 2018]. Dostupné z:
<https://www.nature.com/protocolexchange/system/uploads/2863/original/Semi-dry-Fig2c.jpg?1387365997>
7. *Přehled čištění imunoprecipátů před kvantifikací pomocí qPCR*, Agencourt AMPure XP PCR Purification, 2016 [online], [cit. 25. 11. 2018]. Dostupné z:
<https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/techdocs?docname=B37419>